

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «НПО ДНК-Технология»

Д.Ю.Трофимов

2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК

вируса герпеса человека 6 типа

методом полимеразной цепной реакции

(ННУ6)

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ННУ6 предназначен для выявления ДНК вируса герпеса человека 6 типа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологическом материале человека (лимфоциты периферической крови, ликворе, слюне, моче и др.).

1.2. Набор может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор реагентов ННУ6 основан на использовании амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации

закljučается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

В наборе HHV6 в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

В наборах в формате «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» и «в режиме реального времени» в смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфического продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомого фрагмента генома вируса герпеса человека 6 типа и внутреннего контрольного образца (ВК), мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации фрагмента генома вируса герпеса человека 6 типа и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь

происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

А. СОСТАВ НАБОРА

В зависимости от способа детекции результатов амплификации набор выпускается в трёх форматах:

формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора;

формат «в режиме реального времени» предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов;

формат «с детекцией методом электрофореза» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

В зависимости от формата детекции в набор включается соответствующий комплект для ПЦР-амплификации.

Набор состоит из следующих комплектов:

а) комплект реагентов для выделения лимфоцитов периферической крови (ПРОБА-ФИКОЛЛ)*:

- раствор для выделения лимфоцитов из цельной крови (Фиколл-урографин) – 100 пробирок (по 500 мкл).

* Включается в набор по желанию заказчика.

б) комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК)*, включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);

Комплект является универсальным для всех форматов.

*Включается в набор по желанию заказчика.

в) комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-ГС)*, включает:

- лизирующий раствор, 15 мл 1 флакон;
- сорбент, по 1,0 мл 2 пробирки;
- промывочный раствор №1, 20 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 20 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №3, 20 мл 1 флакон;
- элюирующий раствор, 10 мл 1 флакон.

Комплект является универсальным для всех форматов.

*Включается в набор по желанию заказчика.

г) комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК вируса герпеса человека 6-го типа с флуоресцентной детекцией по конечной точке включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 100 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Таq-полимеразы – 2 пробирки (по 500 мкл);
- ПЦР-буфер – 1 пробирка (200 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец «К+» – 1 пробирка (150 мкл);

д) комплект реагентов для ПЦР - амплификации ДНК вируса герпеса человека 6 типа в режиме реального времени, включающий:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 100 пробирок (по 20 мкл)/12 стрипов по 8 пробирок (20 мкл);
- раствор Таq-полимеразы – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец «К+» - 1 пробирка (150 мкл);

е) комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК вируса герпеса человека 6 типа с детекцией методом электрофореза, включающий:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 100 пробирок (по 20 мкл);

- раствор Таq-полимеразы – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец «К+» - 1 пробирка (150 мкл);

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, внутренний контрольный образец. В наборах форматов «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» и «в режиме реального времени» в состав смеси для амплификации входят флуоресцентные ДНК-зонды.

ПЦР-буфер включен только в комплекты для набора формата «с флуоресцентной детекцией по конечной точке».

Комплект является специфичным для каждого формата («с флуоресцентной детекцией по конечной точке», «в режиме реального времени», «с детекцией методом электрофореза»).

ж) комплект реагентов для детекции ДНК методом электрофореза включает:

- смесь для электрофореза - 1 пакет (16,9 г);
- агарозный гель - 5 пластинок.

Комплект используется в наборе формата «с детекцией методом электрофореза».

Время проведения анализа - 4 ч.

Набор рассчитан на проведение 100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК вируса герпеса человека 6 типа, ПЦР-детектор (формат «с флуоресцентной детекцией по

конечной точке») или детектирующий амплификатор (формат «в режиме реального времени») должны регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза (формат «с детекцией методом электрофореза»), должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса герпеса человека 6 типа размером 277 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК вируса герпеса человека 6 типа, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат. При использовании метода электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса герпеса человека 6 типа размером 277 п.н., отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

3.2 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА: 1000 геном-эквивалентов ДНК вируса герпеса человека 6 типа на 1 мл образца.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.2 Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.3 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки без талька.

4.5 При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6 Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.7 Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или в ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

4.8 При использовании набора формата «с детекцией методом электрофореза» для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК, проведения ПЦР и электрофорез следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими принадлежностями.

4.9 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.10 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.11 Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

4.12 Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

4.13 Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

4.14 При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с набором реагентов ННУ6 требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор (для форматов «с детекцией методом электрофореза» и «с флуоресцентной детекцией по конечной точке») или детектирующий амплификатор (для формата «в режиме реального времени»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный на 50 °С;
- микроцентрифуга/вортекс со скоростью вращения 1000-3000 об/мин;

- холодильник бытовой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-10 мкл, 2,0-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

При работе с набором в формате «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» для детекции результатов требуется:

- ПЦР-детектор.

При детекции методом электрофореза (формат «с детекцией методом электрофореза») требуются:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1,0 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1,0 мм.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Взятие периферической крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2-3 раза после взятия материала.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2 Слюну (примерно 500 мкл) перенести в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

6.3 Порцию (примерно 50 мл) утренней мочи следует собрать в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

6.4 Ликвор (0,5-1,0 мл) перенести в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

Допускается хранение образцов при температуре 2-8 °С не более 24 ч.

Примечание: перед взятием соскоба из цервикального канала необходимо удалить слизь стерильным ватным тампоном.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА К ВЫДЕЛЕНИЮ ДНК

7.1.1 Подготовка периферической крови (выделение лимфоцитов).

Внимание! Одновременно с выделением лимфоцитов из биологического материала необходимо провести пробоподготовку отрицательного контрольного образца «К-».

7.1.1.1 Промаркировать для каждого образца (в том числе для отрицательного контрольного образца) по две пробирки пластиковые объемом 1,5 мл («А» и «В») и по одной пробирке с раствором для выделения лимфоцитов (фиколл-урографин).

7.1.1.2 Внести:

- в пробирки, промаркированные «А» - 500 мкл физиологического раствора стерильного,
- в пробирки, промаркированные «В» - 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

7.1.1.3 Добавить в пробирки, промаркированные «А», 500 мкл предварительно перемешанной пипетированием периферической крови. В пробирку «А» для отрицательного контрольного образца, добавить 500 мкл физиологического раствора стерильного. Перемешать содержимое каждой пробирки пипетированием.

7.1.1.4 Наслоить в промаркированные пробирки, содержащие раствор для выделения лимфоцитов (фиколл-урографин) 1,0 мл содержимого пробирок «А», не допуская смешивания жидкостей, закрыть крышки пробирок.

7.1.1.5 Центрифугировать пробирки при 4000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.1.6 Перенести промежуточную фазу (примерно 500 мкл) в соответствующие пробирки, промаркированные «В», перемешать содержимое пипетированием и закрыть крышку пробирки.

7.1.1.7 Центрифугировать пробирки «В» при 4000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.1.8 Удалить надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.1.1.9 Добавить 500 мкл физиологического раствора стерильного, закрыть крышки пробирок и встряхнуть пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 3-5 с.

7.1.1.10 Центрифугировать пробирки при 4000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.1.11 Удалить надосадочную жидкость, не задевая осадок.

Осадок содержит лимфоциты периферической крови. Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови проводят с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК «ПРОБА-ГС».

Примечание. Допускается хранение выделенных лимфоцитов периферической крови при температуре минус 20 °C в течение 6 месяцев.

7.1.2 Подготовка слюны, ликвора

7.1.2.1 Перенести 500 мкл материала в пробирку пластиковую объёмом 1,5 мл.

7.1.2.2 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.2.3 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.3. Подготовка мочи.

7.1.3.1 Инкубировать мочу при комнатной температуре (18-25 °C) в течение 1 ч.

7.1.3.2 Перемешать содержимое пипетированием.

7.1.3.3 Перенести 1,0 мл в пробирку пластиковую объемом 1,5 мл.

7.1.3.4 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.3.5 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.2 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

7.2.1 Выделение ДНК с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-ГС).

Внимание! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец «К-». Для этого в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл внести 50 мкл физиологического раствора стерильного.

7.2.1.1 В отдельной пластиковой пробирке смешать $150 \times (N+1)$ мкл лизирующего раствора и $20 \times (N+1)$ предварительно ресуспендированного сорбента, где $N+1$ – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

7.2.1.2 Добавить по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.1.3 Термостатировать пробирки при температуре 50 °С в течение 20 мин.

7.2.1.4 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

7.2.1.5 Удалить надосадочную жидкость.

7.2.1.6 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.1.7 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

7.2.1.8 Удалить надосадочную жидкость.

7.2.1.9 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.1.10 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

7.2.1.11 Удалить надосадочную жидкость.

7.2.1.12 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.1.13 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

7.2.1.14 Удалить надосадочную жидкость.

7.2.1.15 Открыть крышки пробирок и термостатировать пробирки при температуре 50 °С в течении 5 мин.

7.2.1.16 Добавить к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.1.17 Термостатировать пробирки при температуре 50 °С в течение 5 мин.

7.2.1.18 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2-8 °С. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить пп. 7.2.1.17 - 7.2.1.18.

Если препарат ДНК предполагается хранить более 7 суток, необходимо надосадочную жидкость (п.7.2.1.18) перенести в новую пробирку и хранить при температуре минус 20 °С в течение 6 месяцев.

Примечание: в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50 °С в течение 15-20 мин.

7.2.2 Выделение ДНК с использованием комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК)

Для исследования необходимо промаркировать необходимое количество чистых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца («К- »).

7.2.2.1 Внести по 10 мкл внутреннего контрольного образца РНК-ВК или ДНК-ВК во все промаркированные пробирки (в случае, если предусмотрено использование ВК).

7.2.2.2 Добавить в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

7.2.2.3 В пробирки для исследуемых образцов добавить по 100 мкл исследуемого материала. За исключением образцов, прошедших предобработку с получением осадка (см. п. 5) и пробирки «К-». В пробирку, маркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.

7.2.2.4 Плотно закрыть крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.2.5 Термостатировать пробирки при температуре 65 °С в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре (18-25 °С).

7.2.2.6 Добавить в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.2.7 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

7.2.2.8 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.2.2.9 Добавить к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.2.2.10 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

7.2.2.11 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.2.2.12 Добавить к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.2.2.13 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

7.2.2.14 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.2.2.15 Открыть крышки пробирок и высушить осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.

7.2.2.16 Добавить к осадку 50 мкл буфера для растворения, встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с.

7.2.2.17 Прогреть пробирки при температуре 65 °С в течение 10 мин.

7.2.2.18 Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.2.19 Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Препарат НК готов для постановки реакции обратной транскрипции (РНК) или проведению ПЦР (ДНК).

Примечание: Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

Препарат ДНК можно хранить при температуре минус 20 °С не более 1 месяца или при температуре минус 70 °С не более 1 года.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Пп. 7.3.1-7.3.3 выполняются в зоне приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР (МУ 1.3.1888-04).

7.3.1 Промаркировать необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, с учетом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке») промаркировать дополнительно две пробирки (ФОН) для контроля фона флуоресценции.

7.3.2 Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок ФОН), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Таq-полимеразы. В пробирки, промаркированные ФОН, добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.3.3 В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.

7.3.4 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения ДНК из биологического материала.

7.3.5 Внести в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», ФОН).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить препараты ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.3.6 В пробирку, промаркированную «К-», внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1), а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.7 В пробирки, промаркированные ФОН, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1).

7.3.8 Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3-5 с.

7.3.9 Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл (табл.1-4).

Таблица 1. Формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке». Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»). Алгоритм регулирования: «точный».

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1	94°C	1 мин	1
2	94°C 64°C 67°C	5 с 5 с 5 с	5
3	94°C 64°C 67°C	1 с 5 с 5 с	40
4	10°C	Хранение	

Таблица 2. Формат «в режиме реального времени» Режим амплификации для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °C 94 °C	1 мин 1 мин 30 с	1
2.	94 °C 64 °C*	30 с 15 с	5
3.	94 °C 64 °C*	10 15	45
4.	10 °C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 3. Формат «в режиме реального времени»
Режим амплификации для амплификатора
iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Режим для dynamicwf.tmo			
№№ п.п	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °C 94 °C	1 мин 1 мин 30 с	1
2.	94 °C 64 °C	30 с 45 с	5
3.	80 °C*	30 с	2
Режим амплификации			
1.	94 °C 64 °C*	10 с 45 с	45
2.	10 °C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 4. Формат «Real-time»
Режим амплификации для амплификатора
iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories)
(при использовании Persistent Well Factor)

№№ блока (Cycle)	Температура (SetPoint)	Время (DwellTime)	Количество циклов (Repeats)
1.	80 °C 94 °C	1 мин 1 мин 30 с	1
2.	94 °C 64 °C	30 с 45 с	5
3.	94 °C 64 °C*	10с 45 с	45
4.	10 °C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 5. Формат «с детекцией методом электрофореза». Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»).
Алгоритм регулирования: «точный».

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °C	1 мин 30 с	1
2.	94 °C 64 °C 72 °C	20 с 5 с 5 с	5
3.	94 °C 64 °C 72 °C	5 с 5 с 5 с	40
4.	10 °C	Хранение	

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2-8 °С в течение 5 суток.

Примечание: При работе с наборами в формате «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» готовые нормировочные пробирки («ФОН») допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Нормировочные пробирки хранить при 2-8 °С в течение 1 месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25 °С), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-ДЕТЕКТОРА

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ АМПЛИФИКАТОРОВ ДТ-322, ДТ-96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см.

«Руководство по эксплуатации» для ДТ-322, ДТ-96). ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации фрагмента вируса герпеса человека 6 типа и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно.

8.3 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ICYCLER IQ, IQ5 (BIO-RAD LABORATORIES)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ, iQ5). ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации фрагмента вируса герпеса человека 6 типа и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно.

8.4 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

8.4.1 Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие диаметром примерно 2-3 мм с помощью стальной проволоки. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в емкости с водопроводной водой.

8.4.2 Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объемом 1 л, добавить

приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 1 недели или при температуре 2-8 °С в течение 1 мес.

8.4.3 Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.4.4 Осторожно внести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор.

8.4.5 Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.4.6 После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.4.7 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.4.8 Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ДЕТЕКТОРА ИЛИ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА

7.2.2.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

7.2.2.1 В биологических образцах, содержащих ДНК вируса герпеса человека 6 типа (специфический продукт):

- программа ПЦР-детектора фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается;
- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта.

7.2.2.1 В биологических образцах, не содержащих ДНК вируса герпеса человека 6 типа:

- программа ПЦР-детектора при положительном результате амплификации внутреннего контрольного образца фиксирует отрицательный результат;

- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта.

7.2.2.1 Результат оценивается как недостоверный в случае:

- отрицательного результата на наличие ДНК вируса герпеса человека 6 типа и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (ПЦР-детектор);
- отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта и для внутреннего контрольного образца (детектирующий амплификатор).

Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

7.2.2.1 Программа ПЦР-детектора фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфического продукта попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

7.2.2.1 При получении положительного результата (ПЦР-детектор) или экспоненциального роста флуоресценции (детектирующий амплификатор) для специфического продукта в отрицательном контрольном образце «К-» результаты

всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.2 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

9.2.1 В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево-красного цвета на уровне полосы положительного контрольного образца, соответствующие фрагменту вируса герпеса человека 6 типа размером 277 п.н. Наличие или отсутствие полосы, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., в этом случае в учет не принимают.

9.2.2 В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту генома вируса герпеса человека 6 типа размером 277 п.н., должны отсутствовать, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

9.2.3 В случае отсутствия в исследуемом образце полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту генома вируса герпеса человека 6 типа размером 277 п.н., и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., результат считают недостоверным.

Недостоверный результат может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК,

либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.2.4 В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту генома специфичного продукта, в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Срок годности набора – 6 мес.

10.2 Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала, ПЦР-амплификации и детекции ДНК методом электрофореза следует хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

10.3 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

10.4 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- лизирующий раствор и промывочный раствор №1 следует хранить в темном месте;
- буферный раствор для электрофореза хранить при температуре 18-25 °С не более 7 дней или при температуре 2-8 °С не более 1 мес.

10.5 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.6 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора HNV6, следует обращаться в ЗАО «НПФ ДНК-Технология» по адресу:

115478, Москва, Каширское ш., д. 23-5, офис 16

телефон/факс (495) 980-45-55

Ведущий научный сотрудник

ЗАО «НПФ ДНК-Технология»,

кандидат биологических наук



Е.В.Гончарова

«12» мая 2009г

«СОГЛАСОВАНО»

Директор

НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН

академик РАМН



Гинцбург А.Л.

«12» сентября 2009г.

