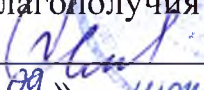


УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека


В.И.Покровский
«09» июне 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению реагента ДНК-полимеразы

«ДиаТак-полимераза»

Реагент «ДиаТак-полимераза» из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, модифицированная, выпускаемая в буфере для хранения. Прозрачная бесцветная жидкость без опалесценции и посторонних включений. Препарат имеет молекулярную массу 94 ± 2 кДа и обладает ДНК-полимеразной активностью, т.е. способностью полимеризовать дНТФ в комплементарную цепь на ДНК-матрицах.

ФОРМА ВЫПУСКА.

Реагент выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает реагент «ДиаТак-полимераза» с активностью 500 ед. (объем 0,1 мл; 1 пробирка), 5-кратный ПЦР-буфер (объем 1,0 мл; 1 пробирка).

Форма 2 включает реагент «ДиаТак-полимераза» с активностью 1000 ед. (объем 0,2 мл; 1 пробирка), 5-кратный ПЦР-буфер (объем 1,0 мл; 1 пробирка).

Форма 3 включает реагент «ДиаТак-полимераза» с активностью 5000 ед. (объем 1,0 мл; 1 пробирка).

Форма 4 включает реагент «ДиаТак-полимераза» с активностью 25000 ед. (объем 5,0 мл; 1 пробирка).

НАЗНАЧЕНИЕ.

ДиаТак-полимераза – ДНК-полимераза, предназначена для полимеризации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов на ДНК-матрицах, в частности, для использования в наборах реагентов для диагностики инфекционных заболеваний, основанных на методе полимеразной цепной реакции.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ.

2,5 единицы фермента ДиаТак-полимеразы (0,5 мкл препарата с концентрацией 5 ед/мкл или 0,25 мкл препарата с концентрацией 10 ед/мкл) позволяют выявлять не менее 10 молекул ДНК в исследуемой пробе (1×10^3 копий/мл) после проведения 40 циклов ПЦР при объеме реакционной смеси 25 мкл.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

1. Амплификатор (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С»», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 мл (например, «Ахуген», США).
6. Штативы для микропробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Оптимальные условия (время инкубации, температура, концентрация фермента, объем пробы ДНК, праймеры, Mg^{2+}) зависят от используемой системы и определяются индивидуально. Оптимальная концентрация Mg^{2+} – (2 – 10) ммоль/л.

В реакцию в объеме 50 мкл берут 5 ед. фермента. В стерильную микропробирку на 0,5 мл типа «Эппендорф» вносят:

- ПЦР-буфер 5-кратный (трис-НСl 340 ммоль/л, сульфат аммония 84 ммоль/л, магния сульфат 15 ммоль/л, ксиленцианол 0,02%, pH 8,3) – 10 мкл;
- Нуклеозидтрифосфаты 10 ммоль/л – по 1 мкл;
- Праймеры – по 5-25 пмоль/л каждого;
- ДиаТак-полимераза 5 ед./мкл – 5 ед./50 мкл;
- Проба ДНК – менее 0,1 мкг в 10 мкл.

Смесь перемешивают, сверху наслаивают минеральное масло (25 мкл), чтобы избежать испарения. Пробирку помещают в амплификатор и проводят обычно 35-45 циклов денатурации-отжига праймеров-полимеризации.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на

электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание следует проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ. При температуре от 2 до 8 °С в не более 5 сут.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ. При температуре не выше минус 16 °С.

СРОК ГОДНОСТИ. 2 года. Реагент с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Рекламации на качество реагента «**ДиаТак-полимераза**» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (495) 241-39-22, факс (495) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-39-39, факс (495) 305-54-23) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-0554, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Директор ФГУН ЦНИИЭ
Роспотребнадзора

В.И. Покровский

