

« УТВЕРЖДАЮ »

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« _____ » _____ 2009 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК вируса гепатита В (*HBV*) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
электрофоретической детекцией продуктов амплификации в
агарозном геле

«АмплиСенс® *HBV*-EPh»

«СОГЛАСОВАНО»

И.о. директора ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора

Мовсисянц А.А.

« 15 » 07

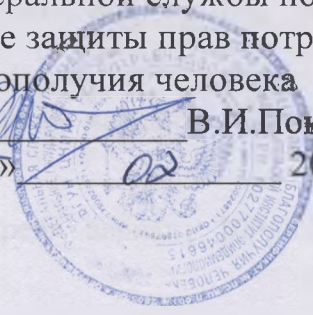
2009 г.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

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

В.И.Покровский
«15» _____ 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
электрофоретической детекцией продуктов амплификации в
агарозном геле

«АмплиСенс® HBV-EPH»

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,5 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,2 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,5 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,2 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,5 мл).

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,2 мл).

Форма 7 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 200.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами 5, 6 и 7 гарантируются только в случае применения дополнительных комплектов реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» и «ЭФ» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 100 (ТУ 9398-004-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость *	45	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость *	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	10 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 проб, включая контроли.

* При хранении лизирующего раствора, раствора для отмывки 1 и раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная бесцветная жидкость *	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 R или вариант 200 – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *HBV* **включает:**

Реактив	Описание	«ПЦР-комплект» вариант 100 R		«ПЦР-комплект» вариант 200	
		Объём (мл)	Кол-во	Объём (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1 <i>HBV</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	---	---	1,1	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-R <i>HBV</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,005	110 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл	---	---
ПЦР-смесь-2 blue	Прозрачная жидкость синего цвета	1,2	1 пробирка	1,2	2 пробирки
Воск для ПЦР	Твердое вещество белого цвета	---	---	1,7	2 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон	8,0	1 флакон
ПКО ДНК <i>HBV</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов вариант 100 R рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

Комплект реагентов вариант 200 рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	«ПЦР-комплект» вариант 100 R		«ПЦР-комплект» вариант 200	
		Объем (мл)	Кол-во	Объем (мл)	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка	1,2	2 пробирки
ВКО HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка	1,0	2 пробирки

Комплект реагентов «ЭФ» вариант 200 (ТУ 9398-070-01897593-2008) – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	1,7 г	2 флакона

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 240 образцов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки).

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® HBV-EPh» предназначен для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Аналитическая чувствительность набора реагентов – не менее 1×10³ копий ДНК HBV в 1 мл плазмы периферической крови.

Формы комплектации 1, 2, 3 и 4 предназначены для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала, проведение ПЦР-амплификации ДНК и детекции продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Формы комплектации 5, 6 и 7 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» для выделения ДНК из клинического материала и комплект реагентов «ЭФ» для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008).

Для проведения анализа используется плазма крови. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку типа Vacuette®, с 6 % раствором ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1,0 мл

крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 10 мин при 3 тыс об/мин, после чего отбирают плазму одноразовым наконечником с аэрозольным барьером и переносят в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл типа «Эппендорф». Хранить плазму можно не более 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года – при температуре не выше минус 68 °С.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
2. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
3. Анализ проводится в три этапа в трёх отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
4. При работе с включенным трансиллюминатором пользоваться защитным экраном или защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой глаз.
5. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое. Запрещается перемещение персонала из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза.
6. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

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

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения ДНК из проб требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы»,

- Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
 3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
 4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
 5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
 6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
 7. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл (например, «Axygen», США).
 8. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
 9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 мкл и 200 мкл (например, «Axygen», США).
 10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
 11. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.
 12. Индивидуальный халат, используемый в данной зоне, и одноразовые перчатки.
 13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации требуются:

1. Амплификатор для микропробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия или эквивалентный); для микропробирок 0,2 мл (например, «Gradient Palm Cycler», «Corbett Research», Австралия или «Maxygene», «Axygen», США).
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 (0,2) мл (например, «Axygen», США).
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 10 мкл и 200 мкл (например, «Axygen», США).

- 7
135
8. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
 9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
 10. Индивидуальный халат, используемый в данной зоне, и одноразовые перчатки.
 11. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 3.

Для детекции продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле требуются:

1. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл (например, «SE-2», «Хеликон», Россия).
2. Источник постоянного тока с напряжением 150 – 460 В (например, «Эльф-4», «ДНК-Технология», Россия).
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия).
4. Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов и передачи изображения (например, «Биотест-1», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия; «BioRad», США).
5. Аквадистиллятор.
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Микроволновая печь для плавления агарозы.
8. Колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл.
9. Мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74).
10. Штатив для микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
11. Отдельный механический или электронный дозатор объемом 10-40 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
12. Одноразовые наконечники до 10 мкл и 200 мкл в штативе (например, «Ахуген», США).
13. Пластиковая ёмкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.
14. Индивидуальный халат, используемый в данной зоне, и одноразовые перчатки.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).

Объем пробы, необходимый для выделения ДНК, – 0,1 мл.

А. При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб».

Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре от 60 до 65 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку **10 мкл ВКО HBV**, затем по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором и ВКО HBV** внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПК О ДНК HBV**.
4. Плотные закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель со внутренней поверхности крышки пробирки.
5. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
6. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. 8.
10. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
11. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °C на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
12. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечник с аэрозольным барьером. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60 °C на 2-

3 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Б. При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп».

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО HBV** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО HBV** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК ДНК HBV**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо отобрать раствор РНК, не захватывая сорбент, перенести в стерильную пробирку и хранить в течение года при температуре не выше минус 68 °С.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

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

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Таq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при температур 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

При использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 R пункты 1 и 2 выполнять не нужно.

1. Пробирку с **воском для ПЦР** прогреть в термостате при температуре 95 °С до полного расплавления.
2. Раскапать на дно микропробирок для амплификации по **5 мкл ПЦР-смеси-1 HBV**. Сверху добавить по капле (примерно 10 – 15 мкл) расплавленного воска так, чтобы он полностью накрыл жидкость, закрыть крышки пробирок, подписать на каждой сокращенное название инфекции. Пробирки с разлитой ПЦР-смесью-1 HBV и воском можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 нед.
3. Отобрать необходимое количество подготовленных в п. 2 пробирок или пробирок с **ПЦР-смесью-1-R HBV** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
4. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2 blue**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с содержимым пробирки под воском.
5. Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).

Б. Проведение ПЦР-амплификации.

1. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.

2. Поставить контрольные реакции амплификации:
- а) отрицательный контроль (К-) - вместо ДНК-пробы внести в подготовленную пробирку 10 мкл ДНК-буфера;
 - б) положительный контроль (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК HBV.
3. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1, 2). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.
- Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 1

Программа амплификации ДНК HBV									
Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):									
«GeneAmp PCR System 2400» («Applied Biosystems»), «Терцик» («ДНК-Технология»)				«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»)			«Maxygene» («Axygen»)		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	2 мин	1	95 °С	2 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	20 с	42	95 °С	30 с	42
	65 °С	10 с		65 °С	20 с		65 °С	45 с	
	72 °С	10 с		72 °С	20 с		72 °С	45 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	4 °С	хранение		4 °С	хранение		10 °С	хранение	

Таблица 2

Программа амплификации ДНК HBV

Амплификаторы с матричным регулированием температуры: «Uno-2» («Biometra»), «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research»)			
цикл	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза	
1	95 °С	2 мин	1
2	95 °С	1 мин	42
	67 °С	1 мин	
	72 °С	1 мин	
3	72 °С	1 мин	1
4	4 °С	хранение	

4. Время амплификации на амплификаторе с регулированием температур по матрице примерно 2 ч 30 мин, на амплификаторе с активным регулированием – 1 ч 50 мин.

5. После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР-амплификации (ЗОНУ 3).

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С (однако, перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

ЭТАП 3. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ.

(проводится в ЗОНЕ 3 – помещении для детекции продуктов ПЦР-амплификации).

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированными ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.

1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить 25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия, довести дистиллированной водой до 500 мл, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Бромид этидия – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Все реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке (см. раздел «Обеззараживание»).

2. Агарозу для электрофореза ДНК из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить 100 мл рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.

3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру,

лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. ДНК, соответственно, движется к положительному. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Порядок работы.

1. Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла по **10–15 мкл проб** и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В **каждом** ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен **К+** и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК.
2. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон») и источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.
3. Когда краситель пройдет примерно половину длины геля (не менее 1,5 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК (см. табл. 3).

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:

- HBV** - 470 п.н.
- ВКО HBV** - 770 п.н.

Таблица 3

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контрольный образец	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		470 п.н.	770 п.н.
«ПК»	Выделение ДНК	Есть	Есть
«ОК»	Выделение ДНК	Нет	Есть
«К-»	ПЦР	Нет	Нет
«К+»	ПЦР	Есть	Нет

1. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа выделения (ПК), должны быть две яркие светящиеся оранжевые полосы: специфическая – на уровне **470 п.н.** и полоса внутреннего контрольного образца – на уровне **770 п.н.**

2. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа выделения (ОК), должна быть только полоса ВКО на уровне 770 п.н.
3. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (К+), должна быть только полоса положительного контроля – 470 п.н., и должна отсутствовать полоса внутреннего контроля 770 п.н.
4. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К-) не должно быть никаких полос, за исключением возможных праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.
5. Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 470 п.н. большей или меньшей интенсивности, независимо от наличия полосы внутреннего контроля. Полоса внутреннего контроля может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией ДНК *HBV*.
6. Отрицательными считаются образцы, которые содержат только полосу 770 п.н. большей или меньшей интенсивности.
7. Кроме полос 470 п.н. и 770 п.н. в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа контрольных точек не совпадают с приведенными в таблице 3, то соответствующий этап анализа следует переделать.
2. Если в дорожке какой-либо из проб отсутствуют обе полосы, и 470 п.н. и 770 п.н., результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой клинической пробы с первого этапа проведения анализа (выделение ДНК). Возможные причины: ошибка в процедуре обработки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибированию ПЦР.
3. Если в дорожке какой-либо из проб отсутствуют обе полосы, и 470 п.н. и 770 п.н., и присутствуют неспецифические полосы на разных уровнях, результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой клинической пробы со второго этапа проведения анализа (проведение ПЦР-амплификации). Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
4. Появление специфической полосы 470 п.н. в любом из отрицательных контрольных образцов (ОК, К-) указывает на контаминацию реактивов или проб. Требуется повторить анализ проб с первого этапа анализа (выделение ДНК), а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
2. Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. На 1 л обезвреживаемых реагентов добавляют 1 л 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 л 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 ч. Для нейтрализации добавляют 1 л 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Нейтрализованные реактивы сбрасывают в канализацию. Отработанный буфер можно дезактивировать с помощью стеклянной колонки емкостью на 1-2 л, заполненной активированным углем. Отработанный буфер пропускать через нее небольшими порциями. Дезактивированный раствор можно сливать в канализацию.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ЭФ» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® HBV-EPh» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22), факс (499) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Директор ФГУН ЦНИИЭ
Роспотребнадзора

В.И.Покровский