

УТВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор

от _____ 200__ г. № _____

ЗАО «НПО ДНК-Технология»



Д.Ю. Гресфимов

«29» / декабря / 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК
человека в режиме реального времени

(КВМ)

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Комплект предназначен для определения и приблизительной оценки количества геномной ДНК человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в препаратах ДНК, полученных из биологического материала человека (соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, конъюнктивы глаза, задней стенки носоглотки и др.), клеточный осадок мочи, кровь и др.).

Комплект рекомендуется использовать:

- для исключения ложноотрицательных результатов при исследовании биологического материала, содержащего клетки эпителия человека (для контроля взятия материала врачом-клиницистом);
- для приблизительной оценки количества геномной ДНК человека.

1.2 Комплект может использоваться в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.



Копия верна
Ген. дир.

Дмитриев В.В.

1.3 Комплект предназначен для применения *in vitro*.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Комплект реагентов KBM основан на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (заготовок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

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

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет разделять регистрировать

результата амплификации ДНК человека и внутреннего контрольного образца. Для проведения ПЦР используют детектирующие амплификаторы.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смещение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2 СОСТАВ КОМПЛЕКТА

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени включает:

- смесь для амплификации, запечатанная парафином - 96 пробирок (по 20 мкл) или 12 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq-полимеразы - 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло - 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец (K+) - 1 пробирка (150 мкл).

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды, внутренний контрольный образец.

2.3 Время проведения анализа - 2 ч.

2.4 Комплект рассчитан на проведение 96 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих геномную ДНК человека, после проведения реакции амплификации, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала, не содержащих геномную ДНК человека, детектирующий амплификатор должен регистрировать отрицательный результат.

3.2 Чувствительность анализа

Аналитическая чувствительность: 10 геном-эквивалентов на амплификационную пробирку.

3.3 Контроль взятия материала

В образцах биологического материала, содержащих геномную ДНК человека в количестве, достаточном для проведения дальнейшего исследования, после проведения реакции амплификации, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат со значением C_p по каналу FAM (специфика) меньше 38.

В образцах биологического материала, не содержащих геномной ДНК человека или содержащих геномную ДНК человека в недостаточном для дальнейшего исследования количестве, детектирующий амплификатор должен

регистрировать либо отрицательный результат, либо положительный результат со значением Ср по каналу FAM (специфика) больше 38.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 При работе с комплектом реагентов 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.).

4.2 Потенциальный риск применения комплекта – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.3 Все компоненты комплекта в используемых концентрациях являются токсичными.

4.4 Работать с комплектом следует в одноразовых резиновых перчатках без пальцев.

4.5 При работе с комплектом 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 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, читативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

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

4.9 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 средств, регламентированных санитарными правилами.

4.10 Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится ПЦР, следует обязательно до и после проведения работ облучать бактерицидными лампами в течение 1 часа.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

При работе с комплектом реагентов КВМ требуются следующие оборудование и материалы:

- детектирующий амплификатор (ДТ-322 или ДТ-96 производства ООО «НПО ДНК-Технология», iCycler iQ5 производства «Bio-Rad Laboratories»)
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пистолетов объемом 1-20 мкл;

- одноразовые перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала. Рекомендуемые комплекты для выделения: «ПРОБА-РАПИД»/«ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА», «ПРОБА-ГС»/«ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА»/«ПРОБА-ГС-Плюс», «ПРОБА-ПК»/«ПРОБА-ПК-Плюс» производства ООО «НПО ДНК-технология». По возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы проб подготовки.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

7.2.1 Промаркировать необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, с учетом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.2 Тщательно перемешать раствор Taq-полимеразы на миксцентрифуге/вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием.

7.2.3 Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл перемешанного раствора Taq-полимеразы.

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

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

7.2.6 Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 1-3 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»).

Примечание. Во избежание контаминации образцы ДНК необходимо наносить пипетками с аэрозольным барьером.

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

7.2.8 Все пробирки центрифугировать при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3-5 с.

7.2.9 Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 1-2, с учетом объема реакционной смеси, равного 55 мкл.

Таблица 1. Режим амплификации для амплификаторов ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Тип блока	Температура	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений
1	цикл	80 °C	1	00	1	
		94 °C	1	30		
2	цикл	94 °C	0	30	5	
		64 °C	0	15		
3	цикл	94 °C	0	10	45	
		64 °C	0	15		
4	хранение	10 °C				

Таблица 2. Режим амплификации для амплификатора iCycler iQ5 (Bio-Rad laboratories). Для данного режима необходимо активировать переключатель «Use persistent well factor»

Cycle	Repeats	Step	Dwell time	Setpoint	PCR/Melt Data Acquisition
1	1	1	1:00	80.0	
		2	1:30	94.0	
2	5	1	0:30	94.0	
		2	0:45	64.0	
3	45	1	0:10	94.0	
		2	0:45	64.0	Real-time
4		1	1:00	10	

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ АМПЛИФИКАТОРОВ ДТ-322 и 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).

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ICYCLER 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 IQ5).

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 Интерпретация результатов

Интерпретация результатов проводится с учетом значений C_T по каналу флуоресценции (канал FAM) и внутреннего контроля (ПЕХ) в соответствии с таблицами 3-4.

Таблица 3. Интерпретация результатов при использовании амплификаторов
ДТ-322 и ДТ-96

Результат по каналу FAM, Cp	Результат по каналу HEX, Cp	Интерпретация*	Количество геномной ДНК на реакцию, нг
менее 23	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	более 750
23 – 32	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	750 – 1,0
32 – 38	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве (за исключением наборов для определения генетических полиморфизмов)	1,0 – 0,01
более 38	27 – 32	ДНК человека присутствует в недостаточном для анализа количестве	менее 0,01
более 38	Более 32	Возможно, в препарате ДНК присутствуют ингибиторы ПЦР	менее 0,01
не определяется	27 – 32	ДНК человека отсутствует или присутствует в следовых количествах	-
не определяется	не определяется или более 32	Результат недостоверный	-

* - только для наборов производства ООО «НПО ДНК-Технология»

Таблица 4 Интерпретация результатов при использовании амплификатора iCycler

Результат по каналу FAM, Cp	Результат по каналу HEX, Cp	Интерпретация*	Количество геномной ДНК на реакцию, нг
менее 18	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	более 750
18 - 27	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	1,0-750
27-33	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве (за исключением наборов для определения генетических полиморфизмов)	1,0-0,01
более 33	22 - 27	ДНК человека присутствует в недостаточном для анализа количестве	менее 0,01
более 33	более 27	Возможно, в препарате ДНК присутствуют ингибиторы ПЦР	менее 0,01
не определяется	22 - 27	ДНК человека отсутствует или присутствует в следовых количествах	-
не определяется	не определяется или более 27	Результат недостоверный	-

*- только для наборов производства ООО «НПО ДНК-Технология»

При получении отрицательных результатов исследования биологического материала человека на наличие патогенов и отрицательных результатов

исследования на наличие геномной ДНК человека рекомендуется повторное взятие материала и повторное проведение исследования.

Недоверенный 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.

9.3 При получении положительного результата на наличие геномной ДНК человека для отрицательного контрольного образца «К-», результаты **всей** составочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ КОМПЛЕКТА

10.1 Срок годности комплекта - 6 мес со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

10.2 Комплект реагентов следует хранить при температуре 2-8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

10.3 Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами **крытого** транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплекта. Допускается транспортирование при температуре от 0 °С до 24 °С в течение 72 часа.

10.4 Комплект с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

10.6 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества комплекта КВМ, следует обращаться по адресу:

117587, Москва, Варшавское ш., д. 125ж, к.6, этаж 11,

телефон/факс (495) 980-45-55

Ведущий научный сотрудник
ЗАО «НИИФ ДНК-Технология»,
кандидат биологических наук



Е.В.Гончарова

Е.В.Гончарова 2009 г

«СОГЛАСОВАНО»

Директор Учреждения Российской Академии
Наук Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова
РАН, член-корр РАН, профессор



/Н.К.Янковский/

«08» февраля 2010 г.

УТВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор

от _____ 200__ г. № _____

ЗАО «НПО ДНК-Технология»



Д.Ю. Профимов

«29» декабря 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК

человека в режиме реального времени

(КВМ)

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Комплект предназначен для определения и приблизительной оценки количества геномной ДНК человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в препаратах ДНК, полученных из биологического материала человека (соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, конъюнктивы глаза, задней стенки носоглотки и др. слизистых, клеточный осадок мочи, кровь и др.).

Комплект рекомендуется использовать:

- для исключения ложноотрицательных результатов при исследовании биологического материала, содержащего клетки эпителия человека (для контроля взятия материала врачом-клиницистом);
- для приблизительной оценки количества геномной ДНК человека.

1.2 Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинской профилактики и научно-исследовательской практике.



Копия kept

1.3 Комплект предназначен для применения *in vitro*.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Комплект реагентов KBM основан на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей выстрелке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

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

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет раздельно регистрировать

результаты амплификации ДНК человека и внутреннего контрольного образца. Для проведения ПЦР используют детектирующие амплификаторы.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается «технологией» приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в реакционную смесь происходит только при нажатии парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-матрице при начальном прогреве пробирки.

2.2 СОСТАВ КОМПЛЕКТА

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени включает:

- смесь для амплификации, запечатанная парафином – 96 пробирок (по 20 мкл) или 12 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq-полимеразы – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1.0 мл);
- положительный контрольный образец (K+) – 1 пробирка (1.0 мкл).

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды, внутренний контрольный образец.

2.3 Время проведения анализа – 2 ч.

2.4 Комплект рассчитан на проведение 96 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих геномную ДНК человека, после проведения реакции амплификации, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала, не содержащих геномную ДНК человека, детектирующий амплификатор должен регистрировать отрицательный результат.

3.2 Чувствительность анализа

Аналитическая чувствительность: 10 геном-эквивалентов на амплификационную пробирку.

3.3 Контроль взятия материала

В образцах биологического материала, содержащих геномную ДНК человека в количестве, достаточном для проведения дальнейшего исследования, после проведения реакции амплификации, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат со значением C_p по каналу FAM (идентифика) меньше 38.

В образцах биологического материала, не содержащих геномной ДНК человека или содержащих геномную ДНК человека в недостаточном для дальнейшего исследования количестве, детектирующий амплификатор должен

регистрации либо отрицательный результат, либо положительный результат со значением Ср по каналу FAM (специфика) больше 38.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 При работе с комплектом реагентов 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.).

4.2 Потенциальный риск применения комплекта – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2008).

4.3 Все компоненты комплекта в используемых концентрациях являются биологическими.

4.4 Работать с комплектом следует в одноразовых резиновых перчатках без пальцев.

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

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

4.7 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.

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

4.9 Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 2.731-99. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и пр.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами.

4.10 Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится ПЦР, следует обязательно до и после проведения работ облучать бактерицидными лампами в течение 1 часа.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

При работе с комплектом реагентов KBM требуются следующие оборудование и материалы:

- детектирующий амплификатор (ДТ-322 или ДТ-96 производства ИО «НПО ДНК-Технология», iCycler iQ5 производства «Bio-Rad Laboratories»);
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;

- одноразовые перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала. Рекомендуемые комплекты для выделения: «ПРОБА-РАПИД»/«ПРОБА РАПИД-ГЕНЕТИКА», «ПРОБА-ГС»/«ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА»/«ПРОБА-ГС-ПЛЮС», «ПРОБА-ИК»/«ПРОБА-ИК-ПЛЮС» производства ООО «НПО ДНК-Генетология». С возможностью использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы предобработки.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

7.2.1 Промаркировать необходимое количество пробирок со ссылок для амплификации, запечатанной парафином, с учетом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.2 Тщательно перемешать раствор Taq-полимеразы на микроцентрифуге/вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием.

7.2.3 Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл перемешанного раствора Taq-полимеразы.

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

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

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

Примечание. Во избежание контаминации образцы ДНК необходимо вносить кончиком пипетки с аэрозольным барьером.

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

7.2.8 Все пробирки центрифугировать при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3-5 с.

7.2.9 Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 1-2, с учетом объема реакционной смеси, равного 25 мкл.

Таблица 1. Режим амплификации для амплификаторов ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Тип блока	Температура	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений
1	цикл	80 °C	1	00	1	
		94 °C	1	30		
2	цикл	94 °C	0	30	5	
		64 °C	0	15		
3	цикл	94 °C	0	10	45	
		64 °C	0	15		
4	хранение	10 °C				

Таблица 2. Режим амплификации для амплификатора iCycler IQ5 (Biorad Laboratories). Для данного режима необходимо активировать переключатель «Use persistent well factor»

Cycle	Repeats	Step	Dwell time	Setpoint	PCR/Melt Data Acquisition
1	1	1	1:00	80,0	
		2	1:30	94,0	
2	5	1	0:30	94,0	
		2	0:45	64,0	
3	45	1	0:10	94,0	
		2	0:45	64,0	Real-time
4		1	1:00	10	

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ АМПЛИФИКАТОРОВ ДТ-322 И 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).

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ICYCLES 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 IQ5).

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 Интерпретация результатов

Интерпретация результатов проводится с учетом значений Ct в канале детекции (канал FAM) и внутреннего контроля (HEX) в соответствии с таблицами 3.1.1.

**Таблица 3. Интерпретация результатов при использовании амплификаторов
ДТ-322 и ДТ-96**

Результат по каналу FAM, Cp	Результат по каналу HEX, Cp	Интерпретация*	Количество геномной ДНК по реакции, нг
менее 23	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	более 750
23 – 32	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	750-1,0
33 – 38	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве (за исключением наборов для определения генетических полиморфизмов)	1,0-0,01
более 38	27 – 32	ДНК человека присутствует в недостаточном для анализа количестве	менее 0,01
более 38	Более 32	Возможно, в препарате ДНК присутствуют ингибиторы ПЦР	менее 0,01
не определяется	27 – 32	ДНК человека отсутствует или присутствует в следовых количествах	.
не определяется	не определяется или более 32	Результат недостоверный	.

* - только для наборов производства ООО «НПО ДНК-Технология»

Таблица 4. Интерпретация результатов при использовании амплификатора iCycler IQ5

Результат по каналу FAM, Cp	Результат по каналу HEX, Cp	Интерпретация*	Количество геномной ДНК на реакцию, нг
менее 18	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	более 750
18 – 27	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	1,0 – 750
27-33	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве (за исключением наборов для определения генетических полиморфизмов)	1,0 – 0,01
более 33	22 – 27	ДНК человека присутствует в недостаточном для анализа количестве	менее 0,01
более 33	более 27	Возможно, в препарате ДНК присутствуют ингибиторы ПЦР	менее 0,01
не определяется	22 – 27	ДНК человека отсутствует или присутствует в следовых количествах	–
не определяется	не определяется или более 27	Результат недостоверный	–

* – только для наборов производства ООО «НПО ДНК-Технология»

При получении отрицательных результатов исследования биологического материала человека на наличие патогенов и отрицательных результатов

исследования на наличие геномной ДНК человека рекомендуется повторное взятие материала и повторное проведение исследования.

Нелюбопытный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным влиянием 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.

9.3 При получении положительного результата на наличие геномной ДНК постановка для отрицательного контрольного образца «К-», результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ КОМПЛЕКТА

10.1 Срок годности комплекта - 6 мес со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

10.2 Комплект реагентов следует хранить при температуре 2-8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

10.3 Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплекта. Допускается транспортирование при температуре от 0 °С до 24 °С в течение 11 часов.

10.4 Комплект с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

10.6 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации..

По вопросам, касающимся качества комплекта КВМ, следует обращаться по адресу:

117587, Москва, Варшавское ш., д. 125ж, к.6, этаж 11,
телефон/факс (495) 980-45-55

Ведущий научный сотрудник
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»,
кандидат биологических наук

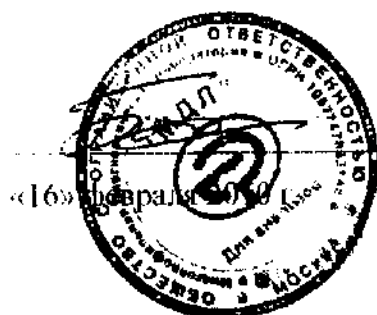


Е.В.Гончарова

«28» декабря 2009 г

«СОГЛАСОВАНО»

Директор
ООО «Многопрофильная
диагностическая лаборатория»
доктор медицинских наук



/М.Н.Болдырева/