



Инструкция по применению набора реagens расположена на сайте www.pcr.ru или www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов
для диагностики *in vitro*
АмплиСенс® Dengue virus-FL

Форма 1 включает
«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123, город
Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



REF Н-2391-1 / VER 01.12.16

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Рекомендуемые комплекты:

- «РИБО-преп» для экстракции РНК из плазмы крови, тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала, мочи, слюны, комаров;
- «МАГНО-сорб» для экстракции РНК из плазмы крови, мочи

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО /СZ-гес) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
ВКО /СZ-гес	10 мкл	в каждую пробирку на дно
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПКО DV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
все образцы	50 мкл	в каждую пробирку
При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» из 200 мкл образца добавить:		
ВКО /СZ-гес	10 мкл	в каждую пробирку на дно
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПКО DV	190 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
Все образцы	50 мкл или 100 мкл ¹	в каждую пробирку

¹ при использовании автоматических станций для экстракции РНК

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» из 1000 мкл образца добавить:		
ВКО ICZ-rec	10 мкл	в каждую пробирку на дно
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПКО DV	990 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
Все образцы	50 мкл или 100 мкл ¹	в каждую пробирку

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК. Допускается хранение проб РНК при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более недели и при температуре не выше минус 68 °С до года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы РНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ОТ-ПЦР; 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL DV.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL DV	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	5*(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5*(N+K+1)	
ТМ-Реввертаза (MMIv)	0,25*(N+K+1)	
RT-G-mix-2	0,25*(N+K+1)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных проб:

Внести по 15 мкл	
приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК, ПК <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избежать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы РНК, экстрагированной из ОК	
Пробы РНК, экстрагированной из ПК	
К+ DV/ ICZ	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей.

5. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы для приборов роторного типа² и планшетного типа³.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных.

Цикл	Программа амплификации ⁴				Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45	95	10 с	–	45
	60	30 с	FAM, JOE		60	20 с	FAM, JOE	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

6. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! При неполной загрузке приборов планшетного типа установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

7. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО ICZ-rec	кДНК Dengue virus

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла (C_t³).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения C_t, необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

² Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

³ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

⁴ Используйте программу амплификации, если нет необходимости использовать единую программу амплификации «АмплиСенс».