



Инструкция по применению набора реагентов расположена на сайте www.pcr.ru



Краткое руководство

набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Norovirus GI / GI-FL*

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



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



REF H-2751-1-3 / VER 27.07.18

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Рекомендуемые комплекты:

- «РИБО-преп» и другие рекомендованные Изготовителем

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный (ОК) контроль экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
ВКО-FL	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)
Элюция		
все образцы	50-100 мкл ¹	в каждую пробирку

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ-ПЦР 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) контроль экстракции.

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

¹ Объем зависит от количества разных наборов реагентов, которыми планируется исследовать полученную РНК

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL <i>Norovirus</i> GI / GII	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-Ревертаза (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 или стрипов для ОТ-ПЦР РНК 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
Пробы РНК, экстрагированной из ОК	
K+ <i>Norovirus</i> GI / GII	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

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. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

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, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	30 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	25 с	FAM, JOE, ROX		60	20 с	FAM, JOE, ROX	
	72	10 с	–					

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 ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Norovirus</i> GII	кДНК <i>Norovirus</i> GI

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

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

⁴ Программы амплификации равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

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_t).

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