



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



Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® *Human enterovirus-FL*

Форма 2: **REF** H-2772-3



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



VER 05.04.21

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «РИБО-преп».

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

Образец / реагент	Объем	Действие
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
Все образцы	50 мкл	в каждую пробирку

ВНИМАНИЕ! 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.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50 F

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

Контроли: 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ОТ-ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i>	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.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов 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
Пробы РНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК
К+ <i>Enterovirus</i>	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 с РНК-пробами и контролями. Время внесения проб в реакционную смесь и запуска реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

Единая программа амплификации «АмплиСенс»				
Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE	

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

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.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора и запустить прибор.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus (Human enterovirus)</i>

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (Ct), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50 F

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

Контроли: 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ОТ-ПЦР; 1 отрицательный (ОК) контроль экстракции.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i>	$10*(N+K+F+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; F – количество образцов «Фон» 1 – запас
ПЦР-буфер-С	$5*(N+K+F+1)$	
RT-G-mix-2	$0,25*(N+K+F+1)$	

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

- Добавить в две пробирки «Фон» по **15 мкл** приготовленной смеси (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Реввертазы (MMIv)) и по **10 мкл К-**. Сверху добавить по 1 капле **минерального масла для ПЦР** при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.
- В оставшуюся часть реакционной смеси добавить необходимое количество **полимеразы (TaqF) и ТМ-Реввертазы (MMIv)**.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
Полимераза (TaqF)	$0,5*(N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ТМ-Реввертаза (MMIv)	$0,25*(N+K+1)$	

Перемешать и осадить капли на вортексе.

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

Внести по 15 мкл	
приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку. Сверху добавить по 1 капле минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки
Внести по 10 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы РНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК
К+ <i>Enterovirus</i>	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси с РНК-пробами и контролями. Время внесения проб в реакционную смесь и запуска реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

- Запрограммировать амплификатор и запустить выполнение программы.

Примечание – Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

Цикл	Для амплификаторов группы 1 ¹			Для амплификаторов группы 2 ²		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	пауза		95	пауза	
1	50	30 мин	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	42	95	10 с	42
	60	10 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
4	72	1 мин	1	72	1 мин	1
5	10	хранение		10	хранение	

¹ «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие, рекомендованные Изготовителем.

² MaxyGene Gradient (Axugen Scientific Inc.) и другие, рекомендованные Изготовителем.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus (Human enterovirus)</i>

Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов).