



Инструкция по применению набора реагентов расположена на сайте [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)



## Краткое руководство

### набор реагентов АмплиСенс® Human enterovirus-FL

Форма 1: **REF** H-2771-3-2



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 <b>ОК</b>
<b>Элюция</b>		
Все образцы	50 мкл	в каждую пробирку

**ВНИМАНИЕ!** Реакцию обратной транскрипции 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**

**Комплекты для обратной транскрипции:**

- «РЕВЕРТА-L».

## ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50-0,2

**Общий объем реакционной смеси:** 30 мкл, включая объем пробы кДНК (10 мкл).

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

- Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL *Enterovirus* для исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.

Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфера-К	в каждую пробирку на поверхность воска, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-FL <i>Enterovirus</i>
Проб кДНК, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы кДНК, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из ОКО	в пробирки для ОК
К+ <i>Enterovirus</i>	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

## АМПЛИФИКАЦИЯ 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. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК (кДНК) возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа 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.

## 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 АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50-0.2**

**Общий объем реакционной смеси:** 30 мкл, включая объем пробы кДНК (10 мкл).

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

- Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL *Enterovirus* для ПЦР исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.

<b>Внести по 20 мкл</b>	
ПЦР-буфера-А-Фон	в две пробирки «Фон» на поверхность воска

**ВНИМАНИЕ!** После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С в защищенном от света месте и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии и того же типа ПЦР-пробирок.

<b>Внести по 10 мкл</b>	
ПЦР-буфера-К	в каждую пробирку для <b>исследуемых и контрольных образцов</b> на поверхность воска, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с <b>ПЦР-смесью-FL <i>Enterovirus</i></b>
Проб кДНК, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы кДНК, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из ОКО	в пробирку для <b>ОК</b>
К+ <i>Enterovirus</i>	в пробирку для <b>К+</b>
К-	в пробирку для <b>К-</b>

## **АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»**

- Запрограммировать амплификатор и запустить выполнение программы.
- Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

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

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

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

## **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:

<b>Флуорофор</b>	<b>FAM</b>	<b>JOE</b>
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).

<sup>1</sup> GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems Group of The Applied Corporation, США) и другие, рекомендованные Изготовителем.

<sup>2</sup> MaxyGene Gradient (Axugen Scientific Inc.) и другие, рекомендованные Изготовителем.