



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



Краткое руководство

набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / tox-genes-FL

Форма 1: H-2841-1-2

Форма 2: H-2842-1

Форма 3: H-2843-1-4



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



16.07.19

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 ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

– «РИБО-преп» и другие, рекомендованные Изготовителем.

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

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

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК

Элюция¹

Все образцы	50 мкл	в каждую пробирку (для форм 1 и 2)
	100 мкл	в каждую пробирку (для формы 3)

¹ Для элюции используют буфер, входящий в состав «РИБО-преп», а также буфер для элюции А, входящий в состав «ПЦР-комплект» вариант FRT-L.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50

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

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

- Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL C. diphtheriae / tox genes** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.

Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфера-А	в каждую пробирку, на поверхность воска, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-FL C. diphtheriae / tox genes
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	
К+ <i>C. diphtheriae</i> / tox genes	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F

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

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

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL C. diphtheriae / tox genes**.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смеси-FL <i>C. diphtheriae</i> / tox genes	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-В	5*(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5*(N+K+1)	

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

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных проб:

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	
К+ <i>C. diphtheriae</i> / tox genes	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

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

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

- Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью C. diphtheriae / tox genes-Lyo** для амплификации исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	
К+ <i>C. diphtheriae</i> / tox genes	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

для «ПЦР-комплект» вариант FRT-50

Цикл	Программа амплификации			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

для «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

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 возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. 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.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX	Cy5
Мишень для амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>C. diphtheriae</i> , ген <i>tox</i>	ДНК <i>C. diphtheriae</i> , ген <i>rhoB</i>	ДНК токсина <i>C. ulcerans</i> , ген <i>tox</i>

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

Принципы интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.