



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

## Краткое руководство

### набор реагентов АмплиСенс® MDR VRE-FL

Форма 1: **REF** HN-3891-1

Форма 2: **REF** HN-3892-1-4



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



**VER** 03.04.20

**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

**Контроли:** Внутренний контрольный образец (ВКО) – в каждом образце<sup>1</sup>.

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

#### **Бактериальные культуры, полученные на плотной питательной среде**

Образец/реагент	Объем	Действие
ГК-экспресс	250 мкл	добавить в каждую пробирку
Бактериальные клетки	10 <sup>7</sup> – 10 <sup>9</sup> клеток	добавить в пробирки для исследуемых образцов
Суспензия бактериальных клеток	20 мкл	

В пробирку для **ОК** (отрицательного контроля экстракции) ничего, кроме реагента ГК-экспресс, не добавлять!

#### **Бактериальные культуры, полученные на жидкой питательной среде**

Образец/реагент	Объем	Действие
ГК-экспресс	250 мкл	добавить в каждую пробирку с осадком бактериальных клеток
Жидкая питательная среда + ГК-экспресс	20 мкл + 250 мкл	добавить в пробирку для <b>ОК</b>

#### **Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:**



- закрыть крышки, перемешать на вортексе, осадить капли;
- прогреть **10 мин** при **70 °С**, перемешать на вортексе;
- центрифугировать **1 мин** при **12 тыс g**

**Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК**

<sup>1</sup> ВКО входит в состав реагента ГК-экспресс.

**ВНИМАНИЕ!** При повторном ПЦР-исследовании проб ДНК содержимое пробирок перемешать на вортексе и повторить центрифугирование.

### **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 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли 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 VRE	$10*(N+K+1)$	<b>N</b> – количество исследуемых образцов; <b>K</b> – количество контролей; <b>1</b> – 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.

<b>Внести по 15 мкл</b>	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
<b>Внести по 10 мкл</b>	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной как образец ОК	в пробирку для ОК
ПКО-1 VRE	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

### **ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L**

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

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

- Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью VRE-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

<b>Внести по 25 мкл</b>	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной как образец ОК	в пробирку для ОК
ПКО-1 VRE	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».

Цикл	Программа «АмплиСенс-В»							
	Приборы роторного типа <sup>2</sup>				Приборы планшетного типа <sup>3</sup>			
	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	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	35	95	5 с	–	35
	60	20 с	<b>FAM, JOE, ROX, Cy5</b>		60	30 с	<b>FAM, JOE, ROX, Cy5</b>	
	72	15 с	–		72	15 с	–	

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

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

<sup>2</sup> Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем

<sup>3</sup> Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

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

### **АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

<b>Канал для флуорофора</b>	<b>FAM</b>	<b>JOE</b>	<b>ROX</b>	<b>Cy5</b>
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ген <i>vanA</i>	ген <i>vanB</i>	ДНК <i>Enterococcus</i> spp.	ДНК ВКО

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