



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

## Краткое руководство

### набор реагентов «АмплиСенс® HBV-FL»

Форма 4

**REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt)



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора,  
Российская Федерация, 111123,  
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А  
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6  
тел. (495) 974 9642,  
e-mail: [amplisens@pcr.ru](mailto:amplisens@pcr.ru)

**IVD**

**VER** 06.06.24

**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-сорб»;
- «РИБО-преп»;
- «МАГНО-сорб».





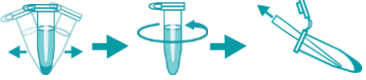
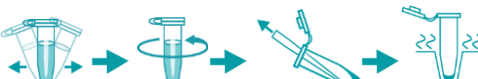
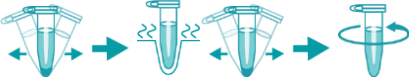
**Контроли:** внутренний контрольный образец (ВКО) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 положительный (ПК) и 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

#### **ОБЪЕМЫ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА, КОНТРОЛЕЙ, ЭЛЮЦИИ ПРИ ЭКСТРАКЦИИ «РИБО-преп», «МАГНО-сорб»**

<b>При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:</b>		
ВКО STI-87	10 мкл	в каждый образец
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для <b>ОК</b>
ОКО + ПКО-1-HBV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для <b>ПК</b>
<b>Элюция</b>		
все образцы	50 мкл	в каждую пробирку
<b>При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:</b>		
ВКО STI-87	10 мкл	в каждый образец
Исследуемые образцы	200 или 1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для <b>ОК</b>
ОКО + ПКО-1-HBV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для <b>ПК</b>
<b>Элюция</b>		
все образцы	70 мкл	в каждую пробирку

## ЭКСТРАКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ «РИБО-сорб»

Образец/реагент	Объем	Действие
ВКО STI-87	10 мкл	добавить в каждую пробирку
Лизирующий раствор	450 мкл	добавить в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	добавить в пробирки для исследуемых образцов
ОКО + ПК-1- <i>HBV</i>	90 мкл + 10 мкл	добавить в пробирку для <b>ПК</b>
ОКО	100 мкл	добавить в пробирку для <b>ОК</b>
<b>Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:</b>		
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, перемешать на вортексе, осадить капли;</li> <li>- поместить в термостат на <b>10 мин</b> при <b>60 °С</b>;</li> <li>- осадить капли</li> </ul>
Сорбент	25 мкл	ресуспендировать, добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, перемешать на вортексе;</li> <li>- оставить на <b>10 мин</b> при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые <b>2 мин</b>;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 1	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 4	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость;</li> <li>- открыть крышки, подсушить осадок <b>12-15 мин</b> при <b>60 °С</b></li> </ul>
РНК-буфер	50 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- прогреть <b>2-3 мин</b> при <b>60 °С</b>, перемешать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>12-13 тыс g</b></li> </ul>
<b>Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК</b>		

**ВНИМАНИЕ!** Отбор очищенной ДНК для проведения ПЦР проводить осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге при 12-13 тыс g в течение 1 мин.

## ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

**Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный контроль ПЦР (К+), 1 положительный (ПК), 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

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

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-1-FL <i>HBV</i>	10x(N+K+1)	<b>N</b> – количество исследуемых образцов; <b>K</b> – количество контролей; <b>1</b> – запас
ПЦР-буфер-В	5x(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5x(N+K+1)	

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

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ПЦР исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл		
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку	
Внести по 10 мкл		
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов	<i>При проведении экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ПК	в пробирку для ПК	
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК	
KB2 <i>HBV</i>	в пробирку для К+	

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

**ВНИМАНИЕ!** При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

## АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО 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.

- Запустить программу амплификации:

- а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *HBV* Soft, детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS);
- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной ниже, настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного типа				Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5	95	5 с	–	5
	60	20 с	–		60	20 с	–	
	72	15 с	–		72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow		60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–		72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** В случае если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 мин) для экономии времени.

## АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *HBV* Soft:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК ВКО	ДНК <i>HBV</i>

**ВНИМАНИЕ!** К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, граничные значения порогового цикла (*C<sub>t</sub>*), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов вручную.