



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

Краткое руководство

набор реагентов «АмплиСенс® TBEV, *B.burgdorferi* sI, *A.phagocytophilum*, *E.chaffeensis* / *E.muris*-FL»

Форма 2 **REF** R-V59-50-F(RG,iQ,Mx,Dt)

REF H-1532-1



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

IVD

VER 13.07.23

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/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «РИБО-преп» для экстракции РНК/ДНК из клещей, цельной венозной крови, ликвора, тканевого материала;
- «МАГНО-сорб» для экстракции РНК/ДНК из клещей и тканевого материала.

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО STI-87-rec) – в каждом образце.

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

ВНИМАНИЕ! Для крови, тканевого материала, ликвора, клещей требуется предварительная подготовка.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО STI-87-rec	10 мкл	в каждую пробирку
Суспензия клещей <i>Ixodes</i>	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
Суспензия клещей <i>Dermacentor</i>	50 мкл	
Цельная венозная кровь и ликвор	осадок и 200 мкл надосадочной жидкости	
Суспензия тканевого материала	50 мкл	

В пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции) реагент **ОКО не вносить!**

Элюция

все образцы	50 мкл	при экстракции из суспензии тканевого материала и суспензии клещей
	100 мкл	при экстракции из осадка клеток ликвора и лейкоцитарного осадка крови

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:		
ВКО-STI-87-рес	10 мкл	в каждую пробирку
Суспензия клещей	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
Суспензия тканевого материала	50 мкл	
В пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции) реагент ОКО не вносить!		
Элюция		
все образцы	100 мкл	

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК/ДНК. Допускается хранение проб РНК/ДНК 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 однократное замораживание-оттаивание проб РНК/ДНК.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКИХ СТАНЦИЙ

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа» (станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей) (например, KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific Oy, Финляндия), Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай)). Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «МАГНО-сорб».

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

Комплекты для обратной транскрипции:

- «РЕВЕРТА-L».

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F

ВНИМАНИЕ! Полученная ДНК/кДНК каждой пробы исследуется в двух пробирках: с ПЦР-смесью-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и с ПЦР-смесью-1-FRT *B.b. sl / ВКО*.

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

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

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления двух реакционных смесей.
- Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и ПЦР-смесью-1-FRT *B.b. sl / ВКО*.
- В двух отдельных пробирках подготовить две реакционные смеси:

Компоненты реакционных смесей	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-1-FRT <i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i> или ПЦР-смесь-1-FRT <i>B.b. sl / ВКО</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)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

- Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных проб.

Внести по 15 мкл	
Приготовленных реакционных смесей	в каждую пробирку для соответствующей реакционной смеси
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК/кДНК, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов, ОК	в две пробирки с различными реакционными смесями для исследуемых образцов, ОК
К-	в две пробирки с различными реакционными смесями для К-
ПКО кДНК <i>TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI</i>	в две пробирки с различными реакционными смесями для К+

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси с пробами ДНК/кДНК и контролями.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Цикл	Программа амплификации							
	для приборов роторного типа				для приборов планшетного типа			
	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	-	1	95	15 мин	-	1
2	95	10 с	-	5	95	10 с	-	5
	60	30 с	-		60	35 с	-	
	72	15 с	-		72	15 с	-	
	95	10 с	-		95	10 с	-	
3	56	30 с	FAM, JOE, ROX	40	56	35 с	FAM, JOE, ROX	40
	72	15 с	-		72	15 с	-	
	95	10 с	-		95	10 с	-	

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

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Первыми в ячейки прибора роторного типа ставятся пробирки с ПЦР-смесью-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* 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

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам и ПЦР-смесям:

Наименование ПЦР-смеси	Канал для флуорофора		
	FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-1-FRT <i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>	кДНК <i>TBEV</i>	ДНК <i>A.phagocytophilum</i>	кДНК <i>E.chaffeensis/E.muris</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>B.b. sl / ВКО</i>	кДНК ВКО STI-87-rec	кДНК <i>B.burgdorferi sl</i>	–

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