



ПАМЯТКА ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ
для обнаружения специфических участков **РНК вируса гепатита С**
в сыворотке или плазме крови человека
методом ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени
(формат качественный и количественный)
БИОТИТР-С

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора, рассчитанного на проведение анализа 100 образцов для выявления РНК возбудителя гепатита С входят 2 комплекта, содержащие готовые к применению реагенты:

- 1 - Комплект для выделения РНК.
- 2 - Комплект для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Комплект для выделения РНК (на 100 образцов)

Внимание! Выделение с помощью реактива «РНК-ЭКСПРЕСС» является принципиальным для работы с данным набором!

	Состав	Комплектация
Формат качественный	1. Реагент РНК-ЭКСПРЕСС	100 пробирок (по 200 мкл)
	2. Положительный контрольный образец *	5 лиофилизированных пробирок
	3. Отрицательный контрольный образец**	5 пробирок (по 300 мкл)
Формат количественный	1. Реагент РНК-ЭКСПРЕСС	100 пробирок (по 200 мкл)
	2. Отрицательный контрольный образец**	5 пробирок (по 300 мкл)
	3. Набор стандартных контрольных образцов***	По 5 лиофилизированных пробирок для каждого стандарта

Комплект для проведения полимеразной цепной реакции «БИОТИТР-С»

Данный комплект универсален для всех форматов набора.

Состав	Комплектация
1. Реакционная смесь*	1 пробирка (1300 мкл)
2. Таq-полимераза	1 пробирка (90 мкл)
3. Обратная транскриптаза (200 ед/мкл)	1 пробирка (25 мкл)
4. Разбавитель	3 пробирки (по 2 мл)
5. Дитиотрейтол (ДТТ)	1 пробирка (30 мкл)
6. Ингибитор рибонуклеаз (20 ед/мкл)	1 пробирка (70 мкл)

Выделение РНК:

1. Промаркировать пробирки с реагентом РНК-ЭКСПРЕСС и расположить их соответствующим образом в штативе, включая пробирки для образцов из комплекта для пробоподготовки:

- отрицательного контрольного образца (для всех форматов),
- стандартных контрольных образцов (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) в случае использования формата «количественный»,
- положительного контрольного образца в случае использования формата «качественный».

2. Добавить в пробирки с лиофилизированными стандартами или положительным контролем в количестве, необходимом для одной постановки, 200 мкл деионизированной воды. Оставить для растворения при комнатной температуре на 30 минут. После этого тщательно перемешать на вортексе в течение 1 минуты и сбросить капли с крышек.

3. Свежую или полностью размороженную сыворотку или плазму крови тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд.

4. Осадить капли на микроцентрифуге.

5. Внести 200 мкл сыворотки или плазмы крови в заранее приготовленную пробирку с реагентом РНК-ЭКСПРЕСС.

6. Внести по 200 мкл отрицательного, положительного или стандартных контрольных образцов (в зависимости от используемого формата набора) из комплекта для пробоподготовки в соответствующие пробирки.

7. Тщательно перемешать импульсным вортексированием 30 секунд.

8. Осадить капли на микроцентрифуге.

9. Поместить в заранее прогретый до 90°C термостат и инкубировать при 90°C в течение 10 минут.

10. Центрифугировать при 12-13 тыс.об./мин. при комнатной температуре в течение 1 минуты.

11. Супернатант использовать в качестве исследуемого образца РНК для постановки амплификации.

Полученный раствор РНК хранению не подлежит!

ПЦР анализ должен быть проведен не позднее, чем через 20-30 минут после выделения РНК!

Постановка реакции амплификации:

1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке бесцветные пробирки с оптическими крышками, соответствующие рекомендациям производителя прибора, вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается!

2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирки с Taq-полимеразой, обратной транскриптазой и ингибитором рибонуклеаз в ледяную баню). Пробирки с полностью размороженным содержимым тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

Внимание! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

3. Приготовить рабочую смесь из расчета на 1 пробу:

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	43
Реакционная смесь	12
Дитиотрейтол (ДТТ)	0,15
Ингибитор рибонуклеаз	0,5
Обратная транскриптаза	0,2
Taq-полимераза	0,8

Тщательно перемешать смесь пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или импульсным вортексированием 15-20 раз.

4. Внести в приготовленные пробирки по 55 мкл полученной рабочей смеси.

5. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 20 мкл:

- в пробирку отрицательного контроля ПЦР – разбавитель;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы РНК;
- в пробирку положительного контрольного образца - положительный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки стандартных контрольных образцов (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶) для количественного определения – соответствующие образцы, прошедшие процедуру выделения;

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

Внимание! ПЦР анализ должен быть проведен не позднее, чем через 20-30 минут после выделения РНК!

Раствор не хранится!

6. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе (если используются плашки или стрипованные пробирки – на предназначенной для этого центрифуге; значение угловой скорости (об/мин) в этом случае может отличаться от указанного).

7. Перенести пробирки в прибор и провести амплификацию по следующей программе:

«CFX 96» (BioRad)

Важно: режим *Emulation Mode iCycler*

«iCycler IQ5» (BioRad)

ДТ-96 (ДНК-Технология)

1	+42°C	40 минут	
2	+93°C	2 минуты	
3	+93°C	20 секунд	45 циклов
	+64°C	20 секунд*	

* измерение флуоресценции по каналам ROX/HEX

«Rotor-Gene 6000» (Corbett Research)

«Rotor-Gene Q» (Corbett Research)

1	+50°C	30 минут	
2	+95°C	15 минуты	
3	+95°C	20 секунд	45 циклов
	+64°C	40 секунд*	

* измерение флуоресценции по каналам Orange/ Yellow

8. Анализ результатов проведите согласно «Руководству по применению наборов реагентов БИОТИТР-С».

Полное «Руководство по применению наборов реагентов БИОТИТР-С» находится на сайте www.lytech.ru в разделе «Методическая информация».

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»: многоканальный телефон (495) 258-39-47