



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

СОСТАВ НАБОРА

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

- 1 - Комплект для выделения ДНК «БИОТИТР-В-ЭКСПРЕСС».
- 2 - Комплект для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Комплект для выделения ДНК « БИОТИТР-В-ЭКСПРЕСС» (на 100 образцов)

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

- Реагент в пробирках (100 шт. по 200 мкл);
- Отрицательный контроль выделения (5 пробирок по 200 мкл)

Комплект для проведения полимеразной цепной реакции «БИОТИТР-В»

Формат	Состав	Комплектация
качественный	10x реакционная смесь	1 пробирка – 575 мкл
	Тaq-полимераза	1 пробирка – 50 мкл
	Разбавитель	2 пробирки – 4 мл
	Внутренний контрольный образец	1 пробирка – 70 мкл
	Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка – 60 мкл
	Отрицательный контрольный образец ПЦР	1 пробирка - 60 мкл
количественный	10x реакционная смесь	1 пробирка – 650 мкл
	Тaq-полимераза	1 пробирка – 60 мкл
	Разбавитель	3 пробирки – 6 мл
	Внутренний контрольный образец	1 пробирка – 70 мкл
	Отрицательный контрольный образец ПЦР	1 пробирка - 60 мкл
	Стандартный контрольный образец ДНК 10 ⁷ ГЭ/мл	1 пробирка – 60 мкл
	Стандартный контрольный образец ДНК 10 ⁶ ГЭ/мл	1 пробирка – 60 мкл
	Стандартный контрольный образец ДНК 10 ⁵ ГЭ/мл	1 пробирка – 60 мкл
	Стандартный контрольный образец ДНК 10 ⁴ ГЭ/мл	1 пробирка – 60 мкл

Выделение ДНК:

1. Промаркировать пробирки с реагентом БИОТИТР-В-ЭКСПРЕСС (включая пробирку для отрицательного контрольного образца выделения) и расположить их соответствующим образом в штативе.
2. Свежую или полностью размороженную сыворотку или плазму крови тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд.
3. Осадить капли на микроцентрифуге.
4. Внести 200 мкл сыворотки или плазмы крови в заранее приготовленную пробирку с реагентом БИОТИТР-В-ЭКСПРЕСС.
5. Тщательно перемешать импульсным вортексированием 10 секунд.
6. Осадить капли на микроцентрифуге.
7. Поместить в заранее прогретый до 99°C термостат и инкубировать при 99°C в течение 25 минут.
8. Дать остыть до 70°C и центрифугировать при 12-13 тыс.об./мин. при комнатной температуре в течение 1 минуты.
9. Супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

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, отрицательного контрольного образца ПЦР и отрицательного контрольного образца выделения. Маркировка пробирок не допускается!

2. За 20-30 мин до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое и тщательно перемешать.

3. Приготовить рабочую смесь из расчета на 1 пробу

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

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	35 мкл
10x реакционная смесь	5 мкл
Внутренний контрольный образец	0,5 мкл
Taq-полимераза	0,4 мкл

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

4. Внести в приготовленные пробирки по 40 мкл полученной рабочей смеси.

5. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 10 мкл:

в пробирку отрицательного контрольного образца выделения – отрицательный контроль выделения;

в пробирку отрицательного контрольного образца ПЦР – отрицательный контрольный образец ПЦР из состава набора;

в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

в пробирки стандартных контрольных образцов для количественного анализа – стандартные образцы с известной концентрацией ДНК (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7);

в пробирку положительного контрольного образца для качественного определения – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

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

6. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе или плашечной центрифуге.

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

«CFX 96» (BioRad)

Важно: режим *Emulation Mode iCycler*

* измерение флуоресценции по каналам FAM/HEX

+94°C	3 мин	42 цикла
+94°C	15 сек	
+64°C	1 мин*	

«iCycler IQ5» (BioRad)

* измерение флуоресценции по каналам FAM/HEX

+94°C	3 мин	42 цикла
+94°C	15 сек	
+64°C	1 мин	
+64°C	15 сек*	

ДТ-96 (ДНК-Технология)

* измерение флуоресценции по каналам FAM/HEX

+94°C	3 мин	42 цикла
+94°C	15 сек	
+64°C	1 мин 15 секунд*	

«Rotor-Gene 6000» (Corbett Research)

«Rotor-Gene Q» (Corbett Research)

* измерение флуоресценции по каналам FAM/HEX

+95°C	3 мин	42 цикла
+95°C	15 сек	
+64°C	60 сек*	

Инструкция по применению к прибору «COBAS TAQMAN 48» (Roche) описана в «Руководстве по применению наборов реагентов БИОТИТР-В».

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

Полное «Руководство по применению наборов реагентов БИОТИТР-В» 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**