

МЕТОДИКА проведения исследования клинического материала (биоптат слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки) на наличие ДНК Хеликобактер пилори (HELICOBACTER PYLORI) методом ПЦР

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ СХЕМА ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ

с использованием наборов реагентов:

ХЕЛИКОПОЛ (*Helicobacter pylori*)

ХЕЛИКОПОЛ СА (*Helicobacter pylori* генотип *cagA*)

ХЕЛИКОПОЛ VA (*Helicobacter pylori* генотип *vacA*)

ХЕЛИКОПОЛ ВА (*Helicobacter pylori* генотип *babA*)

ХЕЛИКОПОЛ IA (*Helicobacter pylori* генотип *ice A*)

выделение ДНК из биопроб - «**Набор для выделения ДНК из биоптата для ХЕЛИКОПОЛ**»

ПРИНЦИП РАБОТЫ МЕТОДА

В основе метода лежит выявление специфического фрагмента ДНК микроорганизма путем накопления (амплификации) копий данного фрагмента (ДНК-мишени) в процессе синтеза новых цепей ДНК.

Полимеразная цепная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеозид-трифосфатов (дНТФ), соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок - праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК-мишени.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различными температурными режимами. На первой стадии при 94°C происходит разделение цепей ДНК, затем при 57-62°C - присоединение (отжиг) праймеров к гомологичным последовательностям на ДНК-мишени, и при температуре 72°C протекает синтез новых цепей ДНК путем удлинения праймера в направлении 5'-3'.

В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 35 циклов наработать фрагмент ДНК, ограниченный парой выбранных праймеров, в количестве, достаточном для его детекции с помощью электрофореза.

Проведение ПЦР-анализа включает 3 лабораторных этапа:

1. обработка клинических проб (выделение ДНК);
2. постановка реакции ПЦР (амплификация);
3. детекция продуктов амплификации (в данной методике - электрофоретическое разделение продуктов в агарозном геле).

ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ И ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ

Требования к помещениям и организации работ изложены в Методических указаниях МУ 1.3.1888-04 "Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности" (Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 04 марта 2004г).

Требования к проведению работ с патогенными микроорганизмами изложены в Санитарных правилах СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами" 1999г.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ и РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1 этап - выделение ДНК из биопроб:

- ламинарный бокс 2 класса защиты;
- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8-12 тыс.об/мин;
- центрифуга для пробирок 50 мл 1,5-3тыс.об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3тыс.об/мин (или вортекс);
- пипетки-дозаторы переменного объема (5-50; 20-200; 100-1000 мкл);
- вакуумный аспиратор (насос) с колбой-ловушкой;
- штатив для хранения пробирок 1,5 мл;
- штатив для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- одноразовые наконечники для дозаторов до 200 мкл и до 1000 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения клинического материала;
- одноразовые перчатки;
- комплект «Набор для выделения ДНК из биоптата для ХЕЛИКОПОЛ»

2 этап - проведение ПЦР (амплификация):

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- программируемый термостат амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3тыс.об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для работы с биопробами;
- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5 - 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации;
- одноразовые наконечники до 200 мкл и до 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл для биопроб;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- комплект реагентов для проведения ПЦР (индивидуален для каждого возбудителя);

3 этап - детекция продуктов амплификации:

- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В;

- УФ-трансиллюминатор;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- технические весы для взвешивания агарозы;
- аквадистиллятор;
- видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключенная к персональному компьютеру;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для нанесения образцов на гель;
- пипетка-дозатор переменного объема 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники до 200 мкл для нанесения образцов;
- одноразовые наконечники до 1000 мкл;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- агароза, раствор бромистого этидия, 50xTAE буфер для приготовления геля и проведения электрофореза (или готовый комплект реагентов для электрофоретической детекции);
- пластиковая емкость большого объема для дезактивации буфера и гелей;

СОСТАВ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ для ПЦР

В состав набора реагентов входят три комплекта :

1. Комплект для пробоподготовки (выделения ДНК)

« **Набор для выделения ДНК из биоптата для ХЕЛИКОПОЛ**» (кат № 020104) (на 50 образцов):

1. Лизирующий раствор.....	5 мл
2. Раствор I	25 мл
3. Раствор II	10 мл
3. Раствор III	100 мл
4. Сорбент	1 мл
5. TE буфер.....	2.5 мл

2. Комплекты для проведения ПЦР (амплификации)

Рассчитаны на проведение анализа 50 исследуемых образцов, 5 положительных контрольных образцов и 5 отрицательных контрольных образцов.

ХЕЛИКОПОЛ (кат № 010111):

Реакционная смесь	150 мкл
Таq-полимераза (5 ед/мкл)	15 мкл
Разбавитель	1 мл
Минеральное масло	1 мл
ДНК контрольная <i>H. pylori</i>	25 мкл

ХЕЛИКОПОЛ СА (кат № 010113):

ПЦР-буфер.....	180 мкл
Раствор дНТФ.....	180 мкл
MgCl ₂	150 мкл
Смесь праймеров <i>casA</i> ...	120 мкл
Таg-полимераза (5ед/мкл)	15 мкл
Контрольная ДНК <i>casA</i>	25 мкл
Вода деионизованная.....	1 мл
Минеральное масло	1 мл

ХЕЛИКОПОЛ VA (кат № 010114):

ПЦР-буфер.....	540 мкл
Раствор дНТФ.....	540 мкл
MgCl ₂	450 мкл
Смесь праймеров <i>vacA s1/s2</i>	120 мкл
Смесь праймеров <i>vacA m1</i>	120 мкл
Смесь праймеров <i>vacA m2</i>	120 мкл
Таg-полимераза (5ед/мкл)	40 мкл
Контрольная ДНК <i>vacA s1/s2</i> (K1)	25 мкл
Контрольная ДНК <i>vacA m1</i> (K2)	25 мкл
Контрольная ДНК <i>vacA m2</i> (K3)	25 мкл

Вода деионизованная.....3 мл
Минеральное масло3 мл

ХЕЛИКОПОЛ ВА (кат № 010116):

ПЦР-буфер180 мкл
Раствор дНТФ.....180 мкл
MgCl₂.....150 мкл
Смесь праймеров babA ...120 мкл
Таg-полимераза (5ед/мкл) 15 мкл
Контрольная ДНК babA....25 мкл
Вода деионизованная.....1 мл
Минеральное масло1 мл

ХЕЛИКОПОЛ IA (кат № 010115):

ПЦР-буфер.....360 мкл
Раствор дНТФ.....360 мкл
MgCl₂.....300 мкл
Смесь праймеров iceA1 ..120 мкл
Смесь праймеров iceA2 ..120 мкл
Таg-полимераза (5ед/мкл) 27 мкл
Контрольная ДНК iceA1 (K1)25 мкл
Контрольная ДНК iceA2 (K2)25 мкл
Вода деионизованная.....2 мл
Минеральное масло 2 мл

3. Комплект для детекции продуктов амплификации

Для детекции продуктов амплификации можно использовать как готовые комплекты, так и отдельные реагенты.

Готовые комплекты:

Комплект №1 (кат №030106) (на 100 –150 образцов)

агароза-2x2г, 50xTAE буфер-25 мл, раствор бромистого этидия-30мкл

Комплект №2 (кат №030107) (на 120 образцов)

2% агарозный гель (40 лунок) –3шт, 50xTAE буфер-25 мл

Отдельные реагенты:

- Агароза (100г/уп; 2г/уп) (кат №030101)
- Раствор бромистого этидия (1мл/уп) (кат №030104)
- 50xTAE буфер (200 мл/уп; 120мл/уп) (кат №030102)
- 2% агарозный гель для электрофореза (40 лунок)(1шт/уп; 5шт/уп)(кат №030108)

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. ВЗЯТИЕ, ДОСТАВКА и ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА

Исследуемый биопсийный материал опускается в стерильную сухую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл.

Пробу доставить в лабораторию в течение 2-х часов (в термосе со льдом) для выделения ДНК или заморозить и хранить при температуре – 20°C не более 2 недель.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

2.1. В 1.5 мл пробирку с биоптатом добавить 100 мкл лизирующего раствора и инкубировать, периодически встряхивая, при 55°C до полного растворения ткани (это процесс занимает от 2 до 4 часов , при необходимости инкубацию можно проводить в течение ночи при 37°C).

2.2. Осадить сконденсированные на внутренней поверхности пробирки капли жидкости центрифугированием в течение 5 сек при 8-12 тыс. об/мин. К полученному лизату добавить 20 мкл суспензии сорбента (перед добавлением суспензию тщательно перемешать на

встряхивателе) и 500 мкл раствора I. (Раствор I перед использованием прогреть на водяной бане 10 мин. при температуре 50-60°C и тщательно перемешать). Полученный раствор перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин., периодически встряхивая на вортексе.

2.3. Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при 8-12 тыс. об/мин. Удалить супернатант.

На всех стадиях обработки клинического материала удаление супернатанта производят одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи вакуумного насоса в колбу-ловушку, содержащую дезинфицирующий раствор (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т.п.)

2.4. К осадку добавить 200 мкл раствора II, перемешать смесь, осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при 8-12 тыс. об/мин., удалить супернатант.

2.5. Промыть сорбент 2 раза 1 мл раствора III, как описано в п.2.4

2.6. Пробирки поместить в твердотельный термостат и подсушить сорбент 5-10 мин при температуре 55-60°C, оставляя пробирки открытыми.

2.7. В пробирки с сорбентом добавить 50 мкл ТЕ буфера, закрыть их, тщательно перемешать на вортексе и инкубировать в течение 5 минут при 55-60°C.

2.8. Пробирки центрифугировать 15 сек при 8-12 тыс.об/мин..

Водную фазу (супернатант) использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

Водную фазу снятую с сорбента можно хранить при температуре -20°C в течение 6 месяцев.

3. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР (амплификация)

3.1. Приготовить и пронумеровать пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл), включая пробирки для положительных и отрицательного контрольных образцов

3.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Размороженные пробирки тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

3.3. Из компонентов набора приготовить смесь реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:

ХЕЛИКОПОЛ:

Разбавитель.....17,5 мкл,

Реакционная смесь.....2,5 мкл,

Taq-полимераза.....0,2мкл

Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций для достоверной дозировки объема фермента

ХЕЛИКОПОЛ СА:

Вода деионизованная.....14,3 мкл

ПЦР-буфер.....3 мкл

Раствор дНТФ.....3 мкл

MgCl₂.....2,5 мкл

Смесь праймеров cagA.....2 мкл

Taq-полимераза (5ед/мкл).....0,2 мкл

ХЕЛИКОПОЛ VA:

Вода деионизованная.....14,3 мкл

ПЦР-буфер.....3 мкл

Раствор дНТФ.....3 мкл

MgCl₂.....2,5 мкл

Смесь праймеров.....2 мкл

Taq-полимераза (5ед/мкл).....0,2 мкл

ХЕЛИКОПОЛ ВА:

Вода деионизованная.....	14,3	мкл
ПЦР-буфер.....	3	мкл
Раствор дНТФ.....	3	мкл
MgCl ₂	2,5	мкл
Смесь праймеров babA	2	мкл
Таg-полимераза (5ед/мкл)	0,2	мкл

ХЕЛИКОПОЛ IA:

Вода деионизованная.....	14,3	мкл
ПЦР-буфер.....	3	мкл
Раствор дНТФ.....	3	мкл
MgCl ₂	2,5	мкл
Смесь праймеров iceA1 либо iceA2.....	2	мкл
Таg-полимераза (5ед/мкл)	0,2	мкл

Для каждой смеси праймеров готовится отдельная амплификационная смесь. Все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

- 3.4. После добавления Таq-полимераза, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.
- 3.5. Добавить по 20 мкл амплификационной смеси во все пробирки, подготовленные для амплификации (для ХЕДИКОПОЛ SA, VA, BA и IA—по 25 мкл).
- 3.6. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.
- 3.7. Внести 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. выделение ДНК) в соответствующую пробирку с амплификационной смесью для проведения амплификации под слой масла.
- 3.8. Внести в пробирки для положительных контрольных образцов по 5 мкл соответствующего положительного контрольного образца ДНК из состава набора, а в пробирку для отрицательного контрольного образца – 5 мкл разбавителя или деионизованной воды из состава набора.
- 3.9. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000g (1,5 –3000 об/мин) при комнатной температуре (+18 – 25°С) на микроцентрифуге-вортексе.
- 3.10. Перенести пробирки в прогретый до температуры +93оС программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующим программам:

ХЕЛИКОПОЛ		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94 °	Pause	
94 °	60 сек	1
94 °	30 сек	5
50 °	30 сек	
72 °	30 сек	
92 °	5 сек	40
50 °	10сек	
72 °	15 сек	
10 °	Storage	

ХЕЛИКОПОЛ BA		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94 °	Pause	
94 °	1 мин	1
94 °	1 мин	35
55 °	1 мин	
72 °	1 мин	
72 °	5 мин	1

10 °	Storage	
------	---------	--

ХЕЛИКОПОЛ СА, IА, VА		
T, °C	время	циклов
94 °	Pause	
94 °	1 мин	1
94 °	1 мин	35 для IceAA2 –40
52 °	1 мин	
72 °	2 мин	
72 °	5 мин	1
10 °	Storage	

Для амплификатора Терцик: режим регулирования – точный; объем реакционной смеси – 40 мкл

4 ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

- 4.1. Залить в аппарат для электрофореза ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ в 50 раз.
- 4.2. К 2,0 г агарозы добавить 2 мл 50х ТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.
- 4.3. Приготовленную смесь расплавить на электрической плите или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл расплавленной агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать.
- 4.4. Охладить расплавленную агарозу до температуры 50-60°C и залить в планшет для заливки геля. Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образцов установить на планшет гребенку, используя зажим типа «бульдог». После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.
- 4.5. Нанести в карманы геля по 10-15 мкл амплификата в последовательности соответствующей нумерации проб. Нанести положительные и отрицательные контроли.
- 4.6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/См геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта 1,5-2см.

Визуализация результатов электрофореза

- 4.7. Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора.
ВНИМАНИЕ! С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.
- 4.8. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

5. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 5.1. В отрицательном контрольном образце (К-) полосы должны отсутствовать. Появление полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.
- 5.2. В положительных контрольных образцах (К+) должна выявляться одна полоса, соответствующая ПК.
- 5.3. Анализируемые пробы:
отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контроля (ПК) свидетельствует об отсутствии ДНК искомого возбудителя в анализируемой пробе; наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю – о присутствии ДНК искомого возбудителя в анализируемой пробе.

5.4. Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра.

Размер фрагментов ДНК

Набор	возбудитель	фрагмент ПК, п.н.
ХЕЛИКОПОЛ	<i>Helicobacter pylori</i>	492
ХЕЛИКОПОЛ СА	генотип sagA	404
ХЕЛИКОПОЛ VA	генотип vacA	vacA s1: 259 + vacA s2: 286 vacA m1: 290 vacA m2: 352
ХЕЛИКОПОЛ ВА	генотип babA	800
ХЕЛИКОПОЛ IA	генотип iceA	iceA1: 250 iceA2: 334

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ и ТРАНСПОРТИРОВКИ РЕАГЕНТОВ

- 6.1.** Комплект «Набор для выделения ДНК из биоптата» должен храниться при +2...+8°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при комнатной температуре не более 2 суток.
- 6.2.** Комплекты для проведения ПЦР должны храниться при температуре минус 18-25°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при температуре не выше 0°C не более 1,5 суток.
- 6.4.** Комплект для электрофоретической детекции №1, агароза, 50xTAE-буфер и раствор бромистого этидия может храниться при комнатной температуре в течение всего срока годности (указан на этикетке).
- 6.5.** Комплект для электрофоретической детекции №2 и готовые агарозные гели должны храниться при +2...+8°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства).

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение методики проведения исследования.

**По вопросам, касающимся качества наборов реагентов, обращаться
в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу:
119435 г.Москва, ул.Малая Пироговская, д.1, стр.3, т./ф. (495) 589-14-03**