

МЕТОДИКА проведения исследования клинического материала (сыворотка или плазма крови) на наличие РНК вирусных гепатитов методом ПЦР

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ СХЕМА ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ

с использованием наборов реагентов:

ПОЛИГЕП С (*Hepatitis C virus*)

ПОЛИГЕП G (*Hepatitis G virus*)

выделение ДНК из биопроб - **«Набор для выделения ДНК/РНК из сыворотки и плазмы крови»**

Приложение:

методика **генотипирования** к-ДНК вируса гепатита С с использованием комплекта **“ПОЛИГЕП С-ген”**

ПРИНЦИП РАБОТЫ МЕТОДА

В основе метода лежит выявление специфического фрагмента РНК вируса путем получения ДНК-копии (к-ДНК) с РНК-матрицы с помощью реакции обратной транскрипции и накопления (амплификации) копий данного фрагмента ДНК-мишени с помощью полимеразной цепной реакции.

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. Для диагностики вирусов гепатитов С и G подобрана “гнездная” (Nested) система праймеров. В этом случае продукт амплификации с внешней парой праймеров служит матрицей для амплификации с внутренней парой праймеров.

Каждый цикл ПЦР 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 40 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 обратной транскрипции и 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;
- 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/РНК из сыворотки и плазмы крови» (универсален для всех возбудителей, присутствующих в анализируемом материале).

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 ОТ и 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, 50хТАЕ 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/РНК из сыворотки или плазмы крови» (кат.№ 020201) (на 100 образцов):

- | | |
|-----------------------------------|---------|
| 1. Денатурирующий раствор | 45 мл |
| 2. Изопропиловый спирт | 30 мл |
| 3. Промывочный раствор | 100 мл |
| 4. Раствор носителя (т-РНК) | 300 мкл |
| 5. Вода деионизованная..... | 5 мл |
| 6. Хлороформ..... | 12 мл |

2. Комплект для проведения ОТ и ПЦР (амплификации)

Данные комплекты выпускаются в двух различных форматах : на 50 реакций и на 100 реакций

Состав комплекта для ОТ и ПЦР «ПОЛИГЕП С» (Hepatitis C virus) (кат.№ 010206) (на 100 реакций):

- | | |
|---|-----------------|
| 1. 10-ти кратный ОТ ПЦР-буфер | 300 мкл |
| 2. Праймеры HCV 1 (внешняя пара) | 300 мкл |
| 3. 10-ти кратная реакционная смесь HCV2 | 300 мкл |
| 4. Обратная транскриптаза (200*ед/мкл) | 10*мкл (2000ед) |
| 5. Буфер для разбавления обратной транскриптазы | 150 мкл |
| 6. Ингибитор РНК-аз (20*ед/мкл)..... | 25*мкл (500 ед) |
| 7. Таq-полимераза (5ед/мкл)..... | 40 мкл |
| 8. Вода деионизованная | 5 мл |
| 9. Минеральное масло | 4 мл |
| 10. Положительный контроль (HCV ⁺) (на 5 выделений) | 250 мкл |

Состав комплекта для ОТ и ПЦР «ПОЛИГЕП G» (Hepatitis G virus) (кат.№ 010207)(на 100 реакций):

- | | |
|---|-----------------|
| 1. 10-ти кратный ОТ ПЦР-буфер | 600 мкл |
| 2. Праймеры HGV 1 (внешняя пара) | 300 мкл |
| 3. Праймеры HGV 2 (внутренняя пара) | 300 мкл |
| 4. Обратная транскриптаза (200*ед/мкл) | 10*мкл (2000ед) |
| 5. Буфер для разбавления обратной транскриптазы | 150 мкл |
| 6. Ингибитор РНК-аз (20*ед/мкл)..... | 25*мкл (500 ед) |
| 7. Таq-полимераза (5ед/мкл)..... | 40 мкл |
| 8. Вода деионизованная | 5 мл |
| 9. Минеральное масло | 4 мл |
| 10. Положительный контроль (HGV ⁺) (на 5 выделений) | 250 мкл |

* - объем и концентрация ферментов, отмеченные звездочкой могут варьировать в различных сериях наборов. Реальные концентрации и объем позиций, отмеченных звездочкой указаны на упаковке и на этикетках компонентов набора.

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-2х2г, 50хТАЕ буфер-25 мл, раствор бромистого этидия-30мкл

Комплект №2 (кат №030107) (на 120 образцов)
2% агарозный гель (40 лунок) –3шт, 50хТАЕ буфер-25 мл

Отдельные реагенты:

- Агароза (100г/уп; 2г/уп) (кат №030101)
- Раствор бромистого этидия (1мл/уп) (кат №030104)
- 50хТАЕ 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, ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА, ДОСТАВКА и ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА

Для получения **сыворотки** венозную кровь собрать в сухую одноразовую пластиковую пробирку и дать крови свернуться (30 мин при комнатной температуре до полного образования сгустка). Пробирку центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре, полученную сыворотку переносят в чистую сухую полипропиленовую пробирку типа Эппендорфф объемом 1,5мл, используя наконечник с фильтром.

Для получения **плазмы** венозную кровь собрать в одноразовую пластиковую пробирку с раствором антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта). *Гепарин использовать не рекомендуется.* Пробирку центрифугировать 20 минут при 3000 об/мин при комнатной температуре, полученную плазму (верхняя фаза) перенести индивидуальным наконечником с фильтром в сухую одноразовую пластиковую пробирку и использовать для выделения РНК.

Цельная нативная кровь *хранению не подлежит!*

Неохлажденные образцы сыворотки и плазмы использовать в течение 2-х часов для выделения РНК. Допускается **хранение** при +4...+8°C не более 1 суток, при –18...-20°C—не более 2-х недель.

Доставка обработанных проб в лабораторию должна проводиться в термосе со льдом или в термоконтейнере в течение 12 часов.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ БИОПРОБ

2.1. В чистые полипропиленовые пробирки типа Эппендорфф объемом 1,5 мл внести по 3 мкл **носителя** и 450 мкл **денатурирующего раствора**.

Денатурирующий раствор содержит фенол! Избегать попадания на кожу и слизистые оболочки.

Пронумеровать пробирки и расположить соответствующим образом в штативе. Аналогично приготовить пробирки для положительного и отрицательного контролей.

2.2. Добавить 50 мкл исследуемой сыворотки или плазмы в соответствующие пробирки, используя наконечники с фильтрами. . В пробирку положительного контроля добавить 50 мкл **положительной контрольной сыворотки** (из состава комплекта), в пробирку отрицательного контроля – 50 мкл **деионизированной воды**. Пробирки плотно закрыть.

2.3. Тщательно перемешать на вортексе в течение 10 сек, а затем инкубировать при комнатной температуре 10 минут.

2.4. Центрифугировать в течение 15 секунд при 12 тыс.об/мин. *Высокоскоростное центрифугирование проводить в центрифуге с крышкой, для обеспечения плотного прижимания крышек пробирок. После каждого этапа центрифугирования желательна протереть внутреннюю поверхность прижимной крышки и поверхность ротора дез.раствором.*

2.5. Добавить 100 мкл **хлороформа**, плотно закрыть пробирки и перемешать на вортексе 5 секунд.

- 2.6. Центрифугировать 5 минут при 12 тыс.об/мин.
- 2.7. Перенести до 300 мкл верхней водной фазы в чистую полипропиленовую пробирку типа Эппендорфф объемом 1,5 мл, содержащую 300 мкл **изопропилового спирта**, используя наконечники с фильтрами. Перемешать на вортексе 5 сек.
- 2.8. Центрифугировать 12 минут при 12 тыс.об/мин. В результате данной манипуляции образуется полупрозрачный рыхлый осадок.
- 2.9. Удалить супернатант вакуумным аспиратором в колбу-ловушку, с использованием одноразовых наконечников, оставляя на дне пробирки около 20 мкл жидкости. *Данную манипуляцию проводить с особой осторожностью, постепенно удаляя супернатант только с верхнего слоя жидкости и не допуская захвата рыхлого осадка. Рекомендуется ориентировать пробирки в роторе центрифуги, обозначая таким образом местоположение осадка.*
- 2.10. В пробирку с осадком добавить 1 мл **промывочного раствора**. Пробирки плотно закрыть, перемешать на вортексе и центрифугировать 10 минут при 12 тыс.об/мин.
- 2.11. Удалить супернатант как можно полнее вакуумным аспиратором в колбу-ловушку, не захватив при этом осадок. Осадок подсушить 20-30 минут при комнатной температуре, оставляя пробирки открытыми.
- 2.12. Добавить 50 мкл **деионизованной воды**, пробирки закрыть, инкубировать 10 минут при комнатной температуре, затем перемешать встряхиванием.
- Раствор очищенной РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции и амплификации. При необходимости длительного сохранения раствор очищенной РНК можно хранить при минус 20°C в течение двух недель.

3. ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ и ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

3.1. Проведение реакции с внешней парой праймеров

- 3.1.1. Приготовить пробирки для проведения амплификации объемом 0,5 мл (или 0,2 мл), пронумеровав их и расположив соответствующим образом в штативе. Приготовить также пробирки для положительного и отрицательного контролей.
- 3.1.2. Извлечь набор для проведения ОТ и ПЦР из морозильника и разморозить содержимое (растворы ферментов находятся в незамерзающем буфере, поэтому пробирки с ферментами надо вынимать из морозильника в последнюю очередь, непосредственно перед внесением в смесь для реакции).

Внимание! В состав комплектов для ОТ и ПЦР входит высококонцентрированный **раствор обратной транскриптазы (ревертазы) с активностью (200 ед/мкл)**. Для проведения реакции фермент необходимо **развести в 10 раз специальным буфером, входящим в состав данного комплекта**.

Методика разведения: В отдельную пробирку добавить 9 мкл буфера для разведения, к нему добавить 1 мкл исходной ревертазы. Смесь тщательно перемешать пипетированием.

Разведенный препарат ревертазы **не хранится**, поэтому разводить фермент необходимо непосредственно перед использованием.

- 3.1.3. Приготовить смесь компонентов для ОТ и амплификации из расчета на 1 пробу:

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

10-ти кратный ОТ ПЦР-буфер	3 мкл
Праймеры HCV1 (или HGV1)	3 мкл
Вода деионизованная	19 мкл
Обратная транскриптаза(после разведения)	(10 ед) 0.5* мкл

Ингибитор рибонуклеаз (5 ед) 0.25* мкл

Тақ-полимераза0.2 мкл

Добавление ферментов производится в последнюю очередь. *Все компоненты необходимо добавлять отдельными наконечниками.*

3.1.4. Смесь перемешать пипетированием и добавить по 25 мкл в каждую пробирку для амплификации.

3.1.5. Внести по одной капле **минерального масла** в каждую пробирку, используя пипетку с наконечником до 1 мл.

3.1.6. Пробирки закрыть, центрифугировать 5 секунд при 3 тыс. об/мин.

3.1.7. Внести по 5 мкл раствора анализируемого образца под слой масла в соответствующие пробирки индивидуальным наконечником с фильтром. Внести 5 мкл отрицательного контроля в пробирку, помеченную как “-“ контроль, и 5 мкл РНК, выделенной из положительной контрольной сыворотки, в пробирку “+” контроля под слой масла.

3.1.8. Поместить пробирки в ограммируемый термостат, нагретый заранее до 42°C, и провести реакцию по следующим программам:

ПОЛИГЕП С (HCV) (1-я стадия)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
42 °	Pause	
42 °	1 час	
94 °	20 сек	5
65 °	15 сек	
72 °	10 сек	
92 °	10 сек	20
65 °	10 сек	
72 °	15 сек	
10 °	Storage	

ПОЛИГЕП G (HGV) (1-я стадия)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
42 °	Pause	
42 °	1 час	
94 °	20 сек	5
65 °	15 сек	
72 °	10 сек	
92 °	10 сек	30
65 °	10 сек	
72 °	15 сек	
10 °	Storage	

3.2. Проведение “гнездой” реакции амплификации с внутренней парой праймеров

3.2.1. Приготовить пробирки для проведения амплификации объемом 0,5 мл (или 0,2 мл), пронумеровав их и расположив соответствующим образом в штативе.

3.2.2. Приготовить смесь компонентов для амплификации из расчета на одну пробу:

Для ПОЛИГЕП С:

10x реакционная смесь HCV2.....3 м

Вода деионизованная.....22 м

Тақ-полимераза.....0,2 мкл

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

Для ПОЛИГЕП G:

10x ОТ ПЦР буфер3 мкл

Праймеры HGV 23 мкл

Вода деионизованная.....22 мкл

Тақ-полимераза.....0,2 мкл

3.2.3. Смесь перемешать пипетированием и добавить по 25 мкл в каждую пробирку для

амплификации.

- 3.2.3. Внести по одной капле **минерального масла** в каждую пробирку, используя пипетку с наконечником до 1 мл.
- 3.2.5. Пробирки закрыть, центрифугировать 5 секунд при 3 тыс. об.мин.
- 3.2.6. Внести по 5 мкл продукта амплификации с внешней парой праймеров в реакционную смесь под слой масла.
- 3.2.7. Поместить пробирки в программируемый термостат, нагретый заранее до 92° С и провести реакцию по следующим программам:

ПОЛИГЕН С (HCV) (2-я стадия)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94°	Pause	
94°	2 мин	1
92°	30 сек	20
70°	30 сек	
10°	Storage	

ПОЛИГЕН G (HGV) (2-я стадия)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
92°	Pause	
92°	5 сек	15
65°	10 сек	
72°	15 сек	
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°С 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. **Отрицательный контроль:** полоса должна отсутствовать. Появление полосы в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации компонентов набора.

5.2. **Положительный контроль:** для **ПОЛИГЕП С:** выявляется одна полоса размером **164 н.п.** для **ПОЛИГЕП G:** выявляется одна полоса размером **286 н.п.**

5.3. **Анализируемые пробы:** отсутствие полосы строго на уровне соответствующего контроля свидетельствует об отсутствии РНК искомого возбудителя в пробе. Наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю указывает на наличие РНК вируса в клинической пробе.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ и ТРАНСПОРТИРОВКИ РЕАГЕНТОВ

6.1. Комплект «Набор для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови» 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 ОТ и 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.

6.3. 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).

6.4. 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).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Методика генотипирования κ-ДНК вируса гепатита С (*Hepatitis C virus*)

Методом ПЦР с использованием комплекта для амплификации **ПОЛИГЕП С-ген** (кат № 010209)

Комплект реагентов ПОЛИГЕП-С-ген предназначен для генотипирования *Hepatitis C virus* (НСV) методом сайт-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, специфичными для генотипов 1в, 1а, 2а/2с, 3а/3с вируса НСV.

Набор рассчитан на проведение исследования 50 анализируемых образцов, 5 положительных контролей и 5 отрицательных контрольных образцов.

Комплект для проведения полимеразной цепной реакции (на 50 определений)

1. 10-ти кратная реакционная смесь НСV 1а..... 180 мкл
2. 10-ти кратная реакционная смесь НСV 1в..... 180 мкл
3. 10-ти кратная реакционная смесь НСV 2а/с 180 мкл
4. 10-ти кратная реакционная смесь НСV 3а/с 180 мкл
5. Таq-полимераза (5ед/мкл)..... 50 мкл
6. Вода деионизованная 12 мл
7. Минеральное масло 5 мл

8. Положительные контроли, содержащие кДНК
1а, 1в, 2а, 3а генотипов HCV (на 5 определений) ... по 25 мкл

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Комплект реагентов ПОЛИГЕП-С-ген может быть использован для установления генотипа вируса гепатита С.

В качестве исследуемого материала используется **раствор ампликонов**, полученных в результате 2-ой стадии амплификации с использованием набора ПОЛИГЕП-С (см. п.3.2.7. на стр.7)

1. Проведение реакции амплификации для определения генотипа

1.1. Приготовить **четыре серии** пробирок для проведения амплификации вместимостью 0.5 мл (или 0,2 мл), пронумеровав их и расположив соответствующим образом в штативе. Приготовить также пробирки для положительного и отрицательного контролей.

1.2. Извлечь набор для проведения ПЦР из морозильника и разморозить содержимое (раствор фермента находится в незамерзающем буфере, поэтому пробирки с ферментом надо вынимать из морозильника в последнюю очередь, непосредственно перед внесением в смесь для реакции).

1.3. Приготовить четыре смеси компонентов для амплификации (*на каждый генотип в отдельной пробирке*) из расчета на 1 пробу:

10-ти кратная реакционная смесь 3 мкл
Вода деионизованная..... 22 мкл
Тaq-полимераза 0.2 мкл

Добавление фермента производится в последнюю очередь.

Все компоненты необходимо добавлять отдельными наконечниками.

1.4. В соответствии с подготовленными смесями обозначить серии пробирок “1а”, “1в”, “2а”, “3а”.
Смесь перемешать пипетированием и добавить по 25 мкл в каждую пробирку для амплификации соответствующей серии.

1.5. Внести по 1 капле **минерального масла** в каждую пробирку, используя пипетку с наконечником до 1 мл.

1.6. Для подготовки образца для анализа необходимо развести фрагменты кДНК генома HCV, полученные в результате второй стадии амплификации участков РНК вируса с использованием набора ПОЛИГЕП-С (раствор ампликонов) в сто раз. Для этого в чистые пробирки для амплификации вместимостью 0.5 мл внести по 200 мкл **деионизованной воды** и по 2 мкл анализируемого образца.

ВНИМАНИЕ! *Процедуру разведения проводить вне ПРЕ-ПЦР помещения (ПЦР-боксы или помещения, в котором готовятся смеси для амплификации).*

1.7. Пробирки закрыть, центрифугировать 5 секунд при 3 тыс. об/мин.

1.8. Внести по 5 мкл раствора разведенного анализируемого образца под слой масла в соответствующие подготовленные пробирки индивидуальным наконечником с фильтром.

Внимание! *Каждый образец анализируется с каждой из четырех подготовленных смесей!*

1.9. Внести 5 мкл **деионизованной воды** в пробирку, помеченную как “-“ контроль, и 5 мкл соответствующего **контрольного образца** в пробирку помеченную как “+” контроль под слой масла.

Внимание! *Контрольные образцы готовы к использованию! Разведения не требуется.*

1.10. Поместить пробирки в программируемый термостат, нагретый заранее до 92°C, и провести реакцию по программе:

<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>Кол-во</i>
--------------	--------------	---------------

		<i>циклов</i>
92°	Pause	
92°	5 сек	25
68°	5 сек	
72°	5 сек	
70°	1 мин	1
10°	Storage	

Режим регулирования – точный; объем реакционной смеси – 45 мкл

2. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

- 2.1. Залить в аппарат для электрофореза ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ в 50 раз.
- 2.2. К 2,0 г агарозы добавить 2 мл 50х ТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.
- 2.3. Приготовленную смесь расплавить на электрической плите или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл расплавленной агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать.
- 2.4. Охладить расплавленную агарозу до температуры 50-60°С 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.
- 2.5. Нанести в карманы геля по 10-15 мкл амплификата в последовательности, соответствующей нумерации проб. Нанести положительные и отрицательные контроли.
- 2.6. 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

- 2.7. Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора.
- ВНИМАНИЕ!** *С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.*
- 2.8. 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.

3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 3.1. Отрицательный контроль: полоса должна отсутствовать. Появление полосы в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации компонентов набора.
- 3.2. Положительные контроли:
 - 1а: выявляется полоса размером **132 н.п.**
 - 1в: выявляется полоса размером **132 н.п.**
 - 2а: выявляется полоса размером **106 н.п.**
 - 3а: выявляется полоса размером **136 н.п.**
- 3.3. Анализируемые пробы: отсутствие полосы строго на уровне соответствующего контроля свидетельствует об отсутствии к-ДНК данного генотипа в анализируемой пробе. Наличие полосы, равной по электрофоретической подвижности соответствующему положительному контролю указывает на наличие к-ДНК данного генотипа в исследуемой пробе.

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

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение методики проведения исследования.

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