



ПАМЯТКА ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ С НАБОРАМИ ФОРМАТА ФЛУОРОПОЛ-РВ. Комплектация Two Step.

1. Достать набор из холодильника и подготовить необходимое количество пробирок с реакционной смесью, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца.

Пробирки с амплификационной смесью расставляются в соответствии с заранее подготовленным протоколом, где указаны номера анализируемых проб, а также пробирки положительного и отрицательного контролей. Если реакция проводится на анализаторе Rotor Gene (Corbett Research), то пробирки могут быть промаркированы

2. Добавить во все пробирки наконечником с аэрозольным фильтром по 5 мкл (Rotor Gene) или 10 мкл (BioRad, ДТ) раствора Таq-полимеразы.

3. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл (Rotor Gene) или 10 мкл (BioRad, ДТ):

- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель из комплекта набора;
- в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта используемого набора;

4. Пробирки плотно закрыть и центрифугировать в течение 15 сек на плашечной центрифуге или микроцентрифуге-вортексе.

5. Перенести пробирки в прибор.

Для работы с наборами ФЛУОРОПОЛ используются каналы
FAM (специфический сигнал)
HEX (сигнал внутреннего контроля)

В случае наборов для выявления ДНК двух возбудителей с дифференцировкой типа в качестве второго специфического канала также используется и канал **ROX**.

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

6. Провести амплификацию по следующей программе:

«CFX 96» (BioRad)

Важно: режим Emulation Mode iCycler

приблизительное время работы
1 час

| | | |
|--------|---------------------|--------------|
| +80 °C | 2 мин | |
| +94 °C | 1 мин 30 сек | |
| +94 °C | 10 сек | 40 циклов |
| +64 °C | 10 сек (считывание) | |
| +72 °C | 20 сек | |

«iCycler IQ5» (BioRad)

ДТ-96 (ДНК-Технология)

приблизительное время работы
1 час 16 мин

| | | |
|--------|----------------------|--------------|
| +80 °C | 2 мин | |
| +94 °C | 1 мин 30 сек | |
| +94 °C | 10 сек | 40 циклов |
| +64 °C | 11* сек (считывание) | |
| +72 °C | 20 сек | |

«Mini-opticon» (BioRad)

приблизительное время работы
1 час 52 мин

| | | |
|--------|---------------------|--------------|
| +80 °C | 2 мин | |
| +94 °C | 1 мин 30 сек | |
| +94 °C | 10 сек | 40 циклов |
| +64 °C | 10 сек | |
| +72 °C | 40 сек | |
| +50 °C | 01 сек (считывание) | |

«iCycler iQ» (BioRad)

ДТ-322 (ДНК-Технология)

«Rotor-Gene 3000» (Corbett Research)

приблизительное время работы
1 час 52 мин

| | | |
|--------|---------------------|--------------|
| +80 °C | 2 мин | |
| +94 °C | 1 мин 30 сек | |
| +94 °C | 10 сек | 40 циклов |
| +64 °C | 10 сек | |
| +72 °C | 40 сек | |
| +50 °C | 15 сек (считывание) | |

«Rotor-Gene 6000» (Corbett Research)

«Rotor-Gene Q» (Corbett Research)

приблизительное время работы
1 час 30 мин

| | | |
|--------|---------------------|--------------|
| +80 °C | 2 мин | |
| +95 °C | 1 мин 30 сек | |
| +95 °C | 10 сек | 40 циклов |
| +60 °C | 20 сек (считывание) | |
| +72 °C | 40 сек | |

* В случае наборов для выявления двух возбудителей с дифференцировкой типа этот шаг следует увеличить до 17-ти секунд.

7. Анализ результатов проведите согласно «Руководству по применению наборов формата ФЛУОРОПОЛ-РВ».

Полное «Руководство по применению наборов формата ФЛУОРОПОЛ-РВ» 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, e-mail: info@lytech.ru
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, дом 1, строение 3