



Мы рекомендуем Вам прочесть эту Инструкцию, даже если Вы использовали набор ранее. Информация могла измениться.

GenPak[®] RNA PCR test

**набор реагентов для обнаружения вирусной
РНК методом
полимеразной цепной реакции**



Для справок и консультаций: тел/факс +7(495)988-61-68,
e.mail lab@galartdiag.ru

*

И н с т р у к ц и я

Июль 2015 г

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Наборы реагентов **GenPak® RNA PCR test** предназначены для качественного обнаружения вирусной или другой РНК в плазме или сыворотке крови, соскобе или смыве слизистой, экстрактах фекалий и др. пробах методом полимеразной цепной реакции, сопряженной с реакцией обратной транскрипции (RT-PCR).
- 1.2. Набор реагентов **GenPak® RNA PCR test** может быть использован в клиническо-диагностической лаборатории для обнаружения РНК вирусной или другой природы при оценке эффективности или корректировке проводимой терапии.
- 1.3. Время проводимого анализа после приготовления рабочих растворов составляет около 5 часов.
- 1.4. Набор реагентов рассчитан на проведение 100 реакций, из них 10 положительных и 10 отрицательных реакций.

2. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

- 2.1. Набор реагентов **GenPak® RNA PCR test** основан на использовании двух сопряженных полимеразных реакций: реакции обратной транскрипции (RT) на основе вирусной или другой РНК для получения кДНК и полимеразной цепной реакции (PCR) для амплификации полученной кДНК матрицы.
- 2.2. Наборы реагентов **GenPak® RNA PCR test** представляют собой лиофилизованные сухие смеси, готовые для амплификации выделенной РНК.
- 2.3. В наборе реагентов для проведения реакции обратной транскрипции использованы случайный нуклеотидный праймер (рандом праймер), обратная транскриптаза (MMLV-RT) и ингибитор РНКаз (RNAsin), а также использованы одна пара праймеров и Taq ДНК полимеразы для проведения PCR. В качестве матрицы для праймеров и проведения RT-PCR использованы консервативные последовательности геномов вирусов или другой РНК.
- 2.4. Детекцию PCR продукта проводят электрофорезом в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в УФ-свете с длиной волны 312 нм. По наличию специфического фрагмента амплификации определенного размера судят о присутствии вирусной или другой РНК в анализируемом материале. Регистрацию результатов проводят визуально, с помощью фотографирования или сканирования видеокамерой.

- 10.12. Осторожно переместить агарозный гель на экран УФ-трансиллюминатора.
- 10.13. Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты.

11. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

- 11.1. В пробе из пробирки, маркированной (+), должна быть видна одна светящаяся полоса ДНК определенного размера (табл.2).
- 11.2. В пробе, маркированной (-), светящаяся полоса ДНК должна отсутствовать.
- 11.3. Наличие светящейся полосы а в анализируемой пробе строго на уровне полосы положительного образца свидетельствует о положительной реакции образца на присутствие РНК вирусного или другого происхождения.
- 11.4. Наличие аналогичной полосы в отрицательном контрольном образце следует рассматривать как результат контаминации. При этом результаты анализа **должны быть обязательно отменены**.
- 11.5. Наличие слабо светящихся полос выше или ниже полосы положительного контрольного образца может быть результатом неспецифической амплификации, которые не должны быть приняты во внимание.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

- 12.1. Все компоненты наборов реагентов **GenPak® RNA PCR test** можно транспортировать при температуре окружающей среды, от минус 20 до 30 °С.
- 12.1. Все компоненты наборов реагентов следует хранить при температуре 2-8 °С в течение 1 года со дня изготовления.
- 12.3. Готовый рабочий раствор **Солевого буфера** следует хранить в герметично закрытой посуде при 2-8 °С 1 год со дня разведения.
- 12.4. Готовый рабочий раствор **ТВЕ буфера** для электрофореза можно хранить при комнатной температуре в течение 1 года месяцев.
- 12.5. Для получения воспроизводимых результатов необходимо строгое соблюдение объемов добавляемых компонентов.



Галарт
Диагностикум

Для справок и консультаций: тел/факс +7(495) 988-61-68,
e.mail lab@galartdiag.ru

*Внимание! При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

зуется также и для приготовления агарозного геля. Готовый **ТВЕ**

буфер может храниться при температуре 20-25 °С в течение 6 месяцев.

10.2. *Приготовление агарозного геля.* В колбу объемом 500 мл внести содержимое флакона с **агарозой**, добавить 200 мл готового **ТВЕ буфера** и поместить колбу на электрическую плитку. Довести содержимое колбы до кипения и после того, как **агароза** полностью расплавится (через 2-3 мин), колбу с агарозой снять с плитки. Готовая **агароза** должна быть прозрачной и не должна содержать нерасплавленных частиц.

* Примечание: Для быстрого приготовления **агарозы** можно использовать микроволновую печь (около 2 мин при “высокой мощности”).

10.3. *Подготовка электрофоретической камеры к заливке агарозного геля.*

Установить крышку с ванночкой на камеру, а платформу для заливки геля поместить в ванночку. Установить гребенку (можно установить 2 или 3 гребенки, в зависимости от количества анализируемых проб) на платформу.

10.4. В коническую колбу с готовой агарозой внести 10 мкл (1 каплю) **бромистого этидия**, осторожно перемешать содержимое колбы равномерными вращательными движениями. После этого расплавленную **агарозу** охладить приблизительно до температуры 50°C при комнатной температуре или в теплой водяной бане.

10.5. Охлажденную приблизительно до температуры 50 °С расплавленную **агарозу** налить на платформу. Толщина слоя **агарозы** должна быть около 4 мм.

10.6. После застывания **агарозы** (примерно через 25 - 30 мин) осторожно, чтобы не порвать карманы, вынуть гребенку, а платформу с агарозным гелем перенести из ванночки в электрофоретическую камеру.

10.7. Залить достаточный объем **ТВЕ буфера** в электрофоретическую камеру так, чтобы буфер покрывал агарозный гель слоем примерно 1-2 мм.

10.8. Отобрать 10 мкл продукта амплификации из-под **Масла** и добавить в соответствующую лунку агарозного геля, осторожно, чтобы предотвратить перетекание PCR продукта из одного кармана в другой.

10.9. Установить крышку на камеру, подключить электрофоретическую камеру к источнику питания, установить на источнике питания напряжение 100-200 В (не более 15 в/см).

10.10. Через 20-30 мин (примерно 1 см прогона синей краски) электрофоретическую камеру отключить от источника питания, отсоединить провода от камеры, снять крышку с электрофоретической камеры.

10.11. Вынуть платформу с агарозным гелем из электрофоретической камеры, дать жидкости стечь с геля и осторожно промыть агарозный гель водой.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. При использовании в качестве исходного материала соответствующих *in vitro* транскриптов (положительный контрольный образец) на агарозном геле после проведения электрофореза продуктов амплификации под УФ светом должна появиться светящаяся полоса, соответствующая определенному размеру (см. табл. 2).

3.2. При использовании в качестве исходного материала отрицательного контрольного образца после проведения электрофореза на агарозном геле полоска желтого цвета должна отсутствовать.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2. При работе с набором и с анализируемыми образцами человека следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как анализируемые пробы человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать HIV, вирус гепатита В,С или другой возбудитель вирусных инфекций.

4.3. При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой глаз.

4.4. Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания, так как высокое напряжение опасно для жизни

4.5. При использовании PCR-наборов для предотвращения контаминации три основных вида работ (подготовка анализируемых проб, проведение RT-PCR и электрофорез) должны быть физически изолированы друг от друга, т.е. размещены в разных помещениях или боксах.

4.6. Постановку PCR следует проводить в ламинарном шкафу.

4.7. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.8. Перемещение персонала и перенос оборудования из комнаты для электрофореза в другие помещения должны проходить под строгим контролем.

Таблица 2

4.9. Смена верхней одежды (халатов), головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза.

4.10. Поверхности рабочих столов, а также помещения в которых проводится постановка RT-PCR, обязательно должны до начала и после проведения работ облучаться УФ светом как минимум по 30 мин

4.10. Химическая посуда и оборудования, которое используется при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом маркированы.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

5.1. Комплект для выделения РНК, включающий:

- **RNA Lysis Reagent** (Лизирующий реагент) - 2 флакона по 20 мл.
- **ExtraGene E** (ЭкстраГен Е), суспензия смеси ионообменников, 1 флакон, 10 мл.
- **NucleoS+** (Суспензия сорбента для РНК) - 2 пробирки по 1 мл.
- **Saline buffer** (Солевой буфер) - 5-кратный, 1 флакон, 10 мл.

5.2. Комплект для проведения RT-PCR, включающий:

- (+) **control** (положительный контрольный образец), готов к применению - красные пробирки с лиофилизованным сухим содержимым **красного цвета**, 10 шт.;
- (-) **control** (отрицательный контрольный образец), готов к применению - синие пробирки с лиофилизованным сухим содержимым **красного цвета**, 10 шт.;
- **RT MasterMix** (ОТ МастерМикс), готов к применению - бесцветные пробирки с лиофилизованным сухим содержимым **красного цвета** для анализа клинических проб, 80 шт.;
- **PCR MasterMix** (ПЦР МастерМикс), готов к применению - бесцветные пробирки с лиофилизованным сухим содержимым **синего цвета** для анализа клинических проб, 100 шт.;
- **RT Diluent** (ОТ Растворитель), 1 пробирка по 0,5 мл;
- **RT Stop Solution** (ОТ Раствор для остановки реакции), 1 пробирка, 1,0 мл;
- **PCR Diluent** (ПЦР Растворитель), 1 пробирка, 1,0 мл;
- **PCR Oil** (ПЦР Масло), 1 пробирка, 2,0 мл

Наименование возбудителя		t ⁰ отжига	Размер PCR прод.
<i>Hepatitis C virus</i>	HCV	58 °C	272
<i>Hepatitis C virus-50</i>	HCV-50	58 °C	242, 272
<i>Hepatitis C virus, 1a type</i>	HCV 1a	58 °C	214
<i>Hepatitis C virus, 1b type</i>	HCV 1b	58 °C	240
<i>Hepatitis C virus, 2a type</i>	HCV 2a	58 °C	196
<i>Hepatitis C virus, 2b type</i>	HCV 2b	58 °C	343
<i>Hepatitis C virus, 3a type</i>	HCV 3a	58 °C	238
<i>Hepatitis G virus</i>	HGV	58 °C	208
<i>Hepatitis D virus</i>	HDV	58 °C	417
<i>Hepatitis A virus</i>	HAV	58 °C	365
<i>Hepatitis E virus</i>	HEV	58 °C	215
<i>Enterovirus</i>	EVs	58 °C	175
<i>Coxsackievirus B3</i>	CVB3	58 °C	225
<i>Rubella virus</i>	RuV	58 °C	315
<i>Tick-borne Encephalitis virus</i>	TBEV	58 °C	171
<i>Human Immunodeficiency virus-50</i>	HIV I -50	62 °C	156,169
<i>Rotavirus</i>	HRV	58 °C	266
<i>Norwalk-like virus</i>	NWL	58 °C	399
<i>West Nile Virus</i>	WNV	58 °C	350
<i>Influenza virus A, general</i>	InfV Agen	58 °C	354
<i>Influenza virus B, general</i>	InfV Bgen	58 °C	196
<i>Influenza virus A-H5</i>	InfV A-H5	60 °C	311
<i>Influenza virus A-H5N1-50</i>	InfV-AH5N1-50	60 °C	311, 339
<i>Human Parainfluenza virus 1</i>	HPIV 1	58 °C	309
<i>Human Parainfluenza virus 2</i>	HPIV 2	58 °C	309
<i>Human Parainfluenza virus 3</i>	HPIV 3	58 °C	309
<i>Human Parainfluenza virus, gen</i>	HPIVgen	58 °C	309
<i>Human Respiratory Syncytial virus</i>	HRSV	58 °C	369
<i>Human Metapneumovirus</i>	HMPV	58 °C	228

9. ПОСТАНОВКА PCR.

- 9.1. Перед началом работы вынуть из холодильника нужное количество бесцветных пробирок **ПЦР МастерМикса** с содержимым **синего цвета** для анализа неизвестных проб и для (-) и (+) **контролей**. Соответственно промаркировать (как в 8.1 и 8.2).
- 9.2. Добавить во все пробирки по **10 мкл ПЦР Растворителя**. Растворение содержимого пробирки не обязательно.
- 9.3. Перенести в соответствующие пробирки **ПЦР МастерМикса** по **10 мкл** содержимое красного цвета после реакции обратной транскрипции, (-) **контроль**, (+) **контроль** и **ОТ МастерМикс** (8.9.).
- 9.4. Добавить во все пробирки по капле (не менее 20 мкл) **ПЦР Масла**.
- 9.5. Пробирки перенести в термоциклер и провести амплификацию в следующем режиме последовательно связанных программ (таблица 1).

Таблица 1

№№ Про- грам.	Контроль температуры		Активное регулирование температуры			
	block, матрица		Внутри пробирки, (tube, точный)		Расчитанное по (30 мкл) алгоритму (sim., быстрый)	
	время	температура	время	температура	время	температура
1	2 мин	95 °С	2 мин	95 °С	2 мин	95 °С
		1 цикл		1 цикл		1 цикл
2	60 сек	95 °С	20 сек	95 °С	20 сек	95 °С
	40 сек	58 °С	20 сек	58 °С	20 сек	58 °С
	60 сек	74 °С	40 сек	74 °С	40 сек	74 °С
		45 циклов		45 циклов		45 циклов
3	120 сек	74 °С	120 сек	74 °С	120 сек	74 °С
		1 цикл		1 цикл		1 цикл

- 9.6. После окончания амплификации все пробирки перенести в комнату для электрофореза.

10. ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

- 10.1. *Приготовление рабочего раствора буфера для электрофореза (TBE)*. Растворить содержимое флакона с **буфером для электрофореза (TBE)** в 1 л дистиллированной воды. Раствор **TBE буфера** исполь-

- 5.3. *Комплект для детекции ДНК, включающий:*

- **TBE buffer (буфер для электрофореза)** - 1 флакон, 10 г;
- **Agarose (агароза)**, готова к применению - 1 флакон, 3 г;
- **BE Dye (краска, бромистый этидий)**, готова к применению - 1 пробирка, 100 мкл;

6. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- 6.1. Программируемый термостат (амплификатор);
- 6.2. Термостат для микропробирок, поддерживающий температуру 65 ± 2 °С
- 6.3. Микроцентрифуга, развивающая ускорение 10000 g;
- 6.4. Ротатор;
- 6.5. Вортекс;
- 6.6. Электрофоретическая камера;
- 6.7. Источник постоянного тока;
- 6.8. УФ - трансиллюминатор;
- 6.9. Холодильник бытовой;
- 6.10. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 10; 20; 100; 200 и 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка не более $\pm 3\%$);
- 6.11. Плитка электрическая или СВЧ-печь;
- 6.12. Водоструйный или аналогичный насос;
- 6.13. Микропробирки для пробоподготовки (1,5 мл);
- 6.14. Колба коническая (500 мл);
- 6.15. Колба мерная (200 мл и 1000 мл);
- 6.16. Цилиндр мерный (500 мл);
- 6.17. Перчатки резиновые медицинские;
- 6.18. Спирт этиловый 96%;
- 6.19. Вода дистиллированная и бидистиллированная.

7. ПРОБОПОДГОТОВКА

- 7.1. *Приготовление рабочего раствора Солевого буфера.* Содержимое флакона с 5-кратным **Солевым буфером** (10 мл) перенести в мерный цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 50 мл, а затем 96% этанолом до метки 300 мл и перемешать. Полученный раствор следует хранить в герметично закрытой посуде при 2-8 °С.
- 7.2. В пробирку с 100 мкл плазмы или сыворотки крови добавить 300 мкл **РНК Лизирующего реагента.**
- 7.3. Добавить в пробирку 20 мкл суспензии сорбента **NucleoS+**. Перед использованием **NucleoS+** следует интенсивно встряхнуть на вортексе до полного гомогенного состояния.
- 7.4. Перемешать пробирку на ротаторе или вручную 5 мин (10-20 об/мин).
- 7.5. Добавить в пробирку 800 мкл **Солевого буфера** и перемешать переворачивая пробирку.
- 7.6. Центрифугировать пробирку при комнатной температуре 10-15 сек при 5000 g. Рекомендуется устанавливать пробирки в роторе центрифуги в одинаковом положении для удобства при последующем удалении супернатанта.
- 7.7. Осторожно, не задевая осадок, удалить супернатант, используя водоструйный насос.
- 7.8. Добавить к осадку 1 мл **Солевого буфера** и тщательно перемешать на вортексе каждую пробирку до полного гомогенного состояния.
- 7.9. Центрифугировать пробирку 5-10 сек. при 5000 g.
- 7.10. Осторожно удалить супернатант.
- 7.11. Повторить положения 7.8, 7.9 и 7.10. Полное удаление супернатанта в положениях 7.7 - 7.11 гарантирует выход чистого РНК продукта.
- 7.12. Посушить пробирку с осадком 5 мин при 65 °С.
- 7.13. Добавить в пробирку 100 мкл **ЭкстраГена Е** и суспендировать дважды с интервалом 15 мин. содержимое пробирки на вортексе 5-10 сек. до получения гомогенной суспензии.
- *Внимание! ЭкстраГен Е следует отбирать от общего объема при постоянном перемешивании.**
- 7.14. Центрифугировать пробирку 1 мин. при максимальных оборотах. (10 000 g).
- 7.15. Перенести супернатант в чистую пробирку или сразу использовать 5 мкл для постановки реакции обратной транскрипции. Готовые препараты РНК не рекомендуется хранить и следует сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

8. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБР.ТРАНСКРИПЦИИ

- 8.1. Перед началом работы вынуть из холодильника нужное количество бесцветных пробирок **ОТ МастерМикса** с содержимым **красного цвета** для анализа клинических проб, одну пробирку **красного цвета (+) контроля** с содержимым **красного цвета** и одну пробирку **синего цвета (-) контроля** с содержимым **красным цветом** для амплификации положительного и отрицательного контролей, соответственно.
- 8.2. Промаркировать соответствующим образом отобранные пробирки.
- 8.3. Добавить во все пробирки, в том числе и в **(-) и (+) контроли** по **5 мкл ОТ Растворителя.**
- 8.4. Добавить в бесцветные пробирки **ОТ МастерМикса** по **5 мкл** готовой для анализа РНК пробы (см. Пробоподготовку 7.15.).
- * Внимание! 1. Для предотвращения кросс-контаминации следует строго соблюдать последовательность внесения образцов: (-) контроль, анализируемые образцы и в конце (+) контроль.**
2. При работе с готовыми анализируемыми образцами рекомендуется использовать специальные наконечники с антиаэрозольными фильтрами.
- 8.5. Добавить в синюю пробирку **(-) контроля** и красную пробирку **(+) контроля** по **5 мкл** исходного чистого супернатанта **ЭкстраГена Е**, свободного от частичек ионообменников (или бидистиллированной воды, свободной от РНК-аз)..
- 8.6. Полностью растворить содержимое **красного цвета** во всех пробирках. Полное растворение может продлиться 8 -10 мин.
- 8.7. Термостатировать пробирки 40 мин при 50 °С. Рекомендуется кратковременное встряхивание во время инкубации.**
- 8.8. Добавить во все пробирки по 10 мкл ОТ Стоп раствора. Термостатировать пробирки 10 мин при 95 °С.**
- 8.9. Провести кратковременное центрифугирование для сброса конденсата с крышек. Пробы готовы для постановки PCR.