



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

GenPak[®] DNA PCR test

*

**набор реагентов для обнаружения ДНК возбудителей
инфекционных заболеваний методом
полимеразной цепной реакции**

(ТУ 9398-001-73867468-2012)

И н с т р у к ц и я



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

Июль 2015 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Наборы реагентов **GenPak® DNA PCR test** предназначены для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний в биологических пробах человека и животных методом полимеразной цепной реакции (PCR).
- 1.2. Наборы реагентов **GenPak® DNA PCR test** могут быть использованы в клинико-диагностической лаборатории для обнаружения ДНК бактериальной, вирусной, грибковой или другой природы и для оценки эффективности проводимой терапии.
- 1.3. Время проводимого анализа составляет не более 4 ч.
- 1.4. Наборы рассчитаны на проведение 100 реакций, из них 10 положительных и 10 отрицательных контрольных образцов.

2. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

- 2.1. Наборы реагентов **GenPak® DNA PCR test** основаны на использовании процесса амплификации ДНК методом PCR, с помощью которого можно размножить определенную последовательность выделенной ДНК в количестве, превышающем в 10^9 раз и выше по сравнению с исходной матрицей ДНК.
- 2.2. Наборы реагентов **GenPak® DNA PCR test** представляют собой лиофилизованные сухие реакционные смеси, готовые для амплификации выделенной ДНК и комплекты для выделения ДНК и электрофореза.
- 2.3. Выделение ДНК рекомендуется проводить несколькими способами по выбору: с помощью пробоподготовки **Ускоренной, Универсальной** или **Магнитной** в зависимости от природы анализируемой биологической пробы.
- 2.4. Детекцию PCR продукта проводят методом электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием под УФ светом с длиной волны 312 нм. По наличию специфического фрагмента амплификации определенного размера судят о присутствии ДНК возбудителя в анализируемом образце. Регистрацию результатов можно проводить визуально, с помощью фотографирования или сканирования видеосистемой.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- 3.1. Специфичность. При использовании в качестве исходного материала нативной ДНК возбудителя (положительный контрольный образец) на агарозном геле после проведения электрофореза продуктов амплификации под УФ-светом должна появиться полоса желтого цвета, соответствующая определенному размеру (табл. 2).
- 3.2. При использовании в качестве исходного материала отрицательного контрольного образца после проведения электрофореза на агарозном геле полоса желтого цвета должна отсутствовать.

<i>Bovine leukemia virus (gag)</i>	proBLV	58 °C	347
<i>Bovine immunodeficiency virus</i>	proBIV	58 °C	382
<i>Bovine herpes virus, I type</i>	BHV I	58 °C	355
<i>Aleutian mink disease parvovirus</i>	AMDV	58 °C	298
<i>Actinomyces spp.</i>	Act	58 °C	280
<i>Actinomyces israelii</i>	Ais	58 °C	280
<i>Atopobium vaginae</i>	Ava	58 °C	240



Галарт
Диагностикум

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

<i>Ehrlichia murris/Yamaguchi</i>	Emu	58 °C	223
<i>Ehrlichia(Anaplasma) phagocytophilum</i>	Eph	58 °C	227
<i>Rickettsia spp.</i>	Ric	58 °C	259
<i>Brucella melitensis.</i>	Bme.	62 °C	442
<i>Francisella tularensis, spp</i>	Fra	58 °C	333
<i>Francisella tularensis, tularensis</i>	Ftu	58 °C	376
<i>Francisella tularensis, holarctica</i>	Fho	58 °C	362
<i>Vibrio cholerae (tox R)</i>	Vcho (toxR)	58 °C	624
<i>Vibrio cholerae (omp W)</i>	Vcho (ompW)	58 °C	441
<i>Tetracycline resistance gene, tetM</i>	tetM	58 °C	430
<i>Tetracycline resistance gene, tetQ</i>	tetQ	58 °C	392
<i>Erythromycin resistance gene, ermF</i>	ermF	58 °C	492
<i>Hepatitis B virus</i>	HBV	58 °C	473
<i>Transfusion transmit.virus,general</i>	TTVgen.	58 °C	276
<i>Transfusion transmitted.virus, types</i>	TTV 1a,1b,2,3	60 °C	415, ...
<i>Parvovirus B19</i>	PV B19	58 °C	743
<i>SEN virus D</i>	SENV-D	58 °C	346
<i>SEN virus H</i>	SENV-H	58 °C	346
<i>SEN virus D/H</i>	SENV-D/H	58 °C	346
<i>Herpes simplex virus 1 type</i>	HSV 1	58 °C	331
<i>Herpes simplex virus 2 type</i>	HSV 2	58 °C	432
<i>Herpes simplex virus 1/2 types</i>	HSV 1/2	58 °C	360
<i>Varicella-zoster virus</i>	VZV	58 °C	381
<i>Epstein-Barr virus</i>	EBV	58 °C	558
<i>Human cytomegalovirus</i>	HCMV	58 °C	451
<i>Human herpes virus 6 type</i>	HHV 6	58 °C	371
<i>Human herpes virus 7 type</i>	HHV 7	58 °C	437
<i>Human herpes virus 8 type</i>	HHV 8	58 °C	272
<i>Adeno-associated virus, type 2</i>	AAV-2	58 °C	450
<i>Human papillomavirus, general</i>	HPVgen.	56 °C	450
<i>Human papillomavirus, 16 type</i>	HPV 16	60 °C	450
<i>Human papillomavirus, 18 type</i>	HPV 18	60 °C	450
<i>Human papillomavirus, 16/18 types</i>	HPV16/18	60 °C	450
<i>Human papillomavirus, high risk</i>	HPV h.r.	58 °C	450
<i>Human papillomavirus, high risk-plus</i>	HPV h.r.+	58 °C	450
<i>Human papillomavirus, low risk</i>	HPV l.r.	58 °C	450
<i>Human papillomavirus,genotyping</i>	HPV typing	60 °C	450
<i>Adenovirus, general</i>	AdV gen	56 °C	242
<i>Adenovirus, genotypes</i>	AdV types	60 °C	242
<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	proHIV I	58 °C	376
<i>HumanT-lymphocytotropic virus I/II</i>	proHTLV I/II	60 °C	375

<i>Poliomavirusis (JCV, BKV, SV40)</i>	JCV,BKV,SV	58 °C	232
--	------------	-------	-----

3.3. Чувствительность реакции составляет около 10 копий матрицы ДНК в 10 мкл анализируемой пробы (около 10³ копий/мл).

3.4. Предусмотрено использование Универсального внутреннего контрольного образца ДНК (УВК) для **а) оценки возможных потерь ДНК при пробоподготовке, б) для мониторинга ингибирования PCR.**

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 4.2. При работе с набором и с анализируемыми биологическими образцами человека следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как анализируемые биологические пробы человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В, С или другой возбудитель вирусной или другой инфекции.
- 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. Для предотвращения контаминации основные виды работ при использовании PCR-наборов (подготовка анализируемых проб, проведение PCR и электрофорез) должны быть физически изолированы друг от друга, т.е. размещены в разных помещениях.
- 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 или перенос оборудования из комнаты для электрофореза в другие помещения должны проходить под строгим контролем.
- 4.9. Смена верхней одежды, 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 PCR, должны обязательно облучаться 25-30 мин. ультрафиолетовым светом до начала и после окончания работ.
- 4.11. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом маркированы и должны храниться отдельно.

- **BE Dye** (этидиум бромид, краска), готов к применению - 1 пробирка, 150 мкл.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

5.1. *Комплект реактивов для Универсальной* пробоподготовки:

- **Lysis reagent** (Лизирующий реагент), готов к применению - 1 флакон, 30 мл;
- **Saline buffer** (Солевой буфер) - 10-кратный буфер, 1 флакон, 10 мл;
- **ExtraGene™** (ЭкстраГен, суспензия смеси гранул ионообменников), готов к применению - 1 флакон, 10 мл;
- **NucleoS™** (Нуклеос, суспензия сорбента), готов к применению - 2 пробирки по 1,0 мл.

5.2. *Комплект реактивов для Ускоренной* пробоподготовки, включающий:

- **ExtraGene™** (ЭкстраГен™, суспензия смеси гранул ионообменников), - 1 флакон, 10 мл;
- **EnzyMix™** (ЭнзиМикс, протеолитический комплекс), 1 пробирка с лиофилизированным сухим содержимым желтого цвета.
- **EnzyMix™ Diluent** (Растворитель ЭнзиМикса), 1 пробирка, 100 мкл

5.3. *Комплект реактивов для Магнитной* пробоподготовки:

- **Lysis reagent** (Лизирующий реагент), готов к применению - 1 флакон, 30 мл,
- **Saline buffer** (Солевой буфер) - 10-кратный, 1 флакон, 10 мл.
- **Magnetic** (Суспензия сорбента), готов к применению – 2 пробирки по 1,0 мл,
- **ExtraGene™** (ЭкстраГен™, суспензия смеси ионообменников), - 1 флакон, 10 мл;

5.4. *Комплект реактивов для постановки PCR:*

- (+) **control** (положительный контрольный образец), готов к применению - красные пробирки с лиофилизированным сухим содержимым синего цвета, 10 шт.;
- (-) **control** (отрицательный контрольный образец), готов к применению - синие пробирки с лиофилизированным сухим содержимым синего цвета, 10 шт.;
- **MasterMix** (МастерМикс), готов к применению - бесцветные пробирки с лиофилизированным сухим содержимым синего цвета для анализа клинических проб, 80 шт.;
- **PCR Diluent** (Растворитель для ПЦР), 1 пробирка, 1,0 мл;
- **PCR Oil** (Масло для ПЦР), 1 пробирка, 2,0 мл.

5.5. *Комплект реактивов для детекции ДНК, включающий:*

- **TBE buffer** (буфер для электрофореза) - 1 флакон, 10 г;
- **Agarose** (агароза), - 1 флакон, 3г;

<i>Gardnerella vaginalis</i>	Gva.	58 °C	424
<i>Escherichia coli, CFT07, uropathogenic</i>	Eco	58 °C	171
<i>Mobiluncus curtisii</i>	Mcu	58 °C	224
<i>Morganella morganii</i>	Mmo	58 °C	356
<i>Bacteroides fragilis</i>	Bfr	58 °C	535
<i>Proteus mirabilis</i>	Pmi	58 °C	448
<i>Prevotella bivia</i>	Pbi	58 °C	279
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pae	58 °C	254
<i>Peotostreptococcus anaerobius</i>	Pan	58 °C	396
<i>Leptospira interrogans</i>	Lin.	58 °C	668
<i>Leptospira spp. (pathogenic serovars)</i>	Lep.	58 °C	423
<i>Treponema pallidum</i>	Tpa.	58 °C	325
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Bbu	58 °C	445
<i>Borrelia garinii</i>	Bga	58 °C	445
<i>Borrelia afzelii</i>	Baf	58 °C	445
<i>Borrelia spp.(burgdof.+garinii+afzelii)</i>	Bor	58 °C	445
<i>Babesia divergens</i>	Bdi	58 °C	187
<i>Babesia canis</i>	Bca	58 °C	224
<i>Babesia equi</i>	Beq	58 °C	203
<i>Babesia microti</i>	Bmi	58 °C	179
<i>Babesia spp.</i>	Bab	58 °C	203
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tgo	58 °C	523
<i>Lactobacillus spp.</i>	Lac	58 °C	239
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Tva.	58 °C	189
<i>Candida albicans</i>	Cal	58 °C	490
<i>Candida glabrata</i>	Cgl	58 °C	295
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Afu	58 °C	456
<i>Pneumocystis carinii</i>	Pca.	58 °C	396
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cne	58 °C	307
<i>Clostridium difficile</i>	Cdi	58 °C	517
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yen	58 °C	373
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Yps	58 °C	272
<i>Yersinia pestis</i>	Ype	58 °C	351
<i>Bacillus anthracis</i>	Ban	58 °C	320
<i>Enterococcus faecalis</i>	Efal	58 °C	499
<i>Enterococcus faecium</i>	Efam	58 °C	541
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cpa	58 °C	475
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cje	58 °C	364
<i>Entamoeba histolitica</i>	Ehi	58 °C	197

<i>Giardia lamblia</i>	Gla	58 °C	318
<i>Ehrlichia spp.</i>	Ehr	58 °C	337

Таблица 2

Наименование возбудителя		t ⁰ отж*	Размер PCR продукта, пн
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Ctr	58 °C	410
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Cpn.	58 °C	448
<i>Chlamydia psittaci</i>	Cps.	58 °C	356
<i>Chlamydia spp.</i>	Chl.	58 °C	560
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mtu.	62 °C	222
<i>Mycobacterium avium, subspp paratubercul.</i>	Mav	62 °C	268
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Min	62 °C	234
<i>Mycobacterium tuberculosis+bovis</i>	M(tu+bo)	62 °C	211
<i>Plasmodium falciparum</i>	Pfa	58 °C	319
<i>Plasmodium vivax</i>	Pvi	58 °C	310
<i>Plasmodium ovale</i>	Pov	58 °C	312
<i>Plasmodium malariae</i>	Pma	58 °C	307
<i>Plasmodium spp.(Pfa+Pvi+Pov+Pma)</i>	Pla	58 °C	319
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Mpn.	58 °C	316
<i>Mycoplasma hominis</i>	Mho.	58 °C	317
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Mge	58 °C	318
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Mfe	58 °C	317
<i>Mycoplasma penetrans</i>	Mpe	58 °C	318
<i>Mycoplasma spp.(Mge+Mho+Mpn+Mfe+Mpe)</i>	Myc	58 °C	316
<i>Legionella pneumophila</i>	Lpn	58 °C	511
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kpn	58 °C	541
<i>Klebsiella spp. (Kpn+Kox+Kva)</i>	Kle	58 °C	282
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kox	58 °C	282
<i>Klebsiella variicola</i>	Kva	58 °C	282
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hin	58 °C	381
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Mca	58 °C	550
<i>Bordetella pertussis</i>	Bpe	58 °C	279
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	Ngo	58 °C	591
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Sag.	58 °C	264
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Spn	58 °C	567
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Spy	58 °C	609
<i>Helicobacter pylori (ure)</i>	Hpy (ure)	58 °C	318
<i>Helicobacter pylori (vacA)</i>	Hpy (vacA)	58 °C	565
<i>Helicobacter pylori (cagA)</i>	Hpy (cagA)	58 °C	682
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lmo	58 °C	226
<i>Listeria spp.</i>	Lis	58 °C	429

<i>Ureaplasma (parvum+ urealytic.)</i>	Ure.	58 °C	554
<i>Ureaplasma parvum, biovar 1</i>	Ura.	58 °C	319
<i>Ureaplasma urealyticum, biovar2</i>	Uur.	58 °C	309

6. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- 6.1. Программируемый термостат (термоциклер);
- 6.2. Термостат для микропробирок, поддерживающий температуру от комнатной до 100±2 °C;
- 6.3. Микроцентрифуга, развивающая ускорение до 10000 об/мин;
- 6.4. Вортекс;
- 6.5. Электрофоретическая камера;
- 6.6. Источник постоянного тока;
- 6.7. УФ-транслюминатор;
- 6.8. Холодильник бытовой;
- 6.9. Пипетки автоматические одноканальные с переменным объемом;
- 6.10. Плитка электрическая или СВЧ-печь;
- 6.11. Водоструйный или аналогичный насос;
- 6.12. Микропробирки (1,5 мл);
- 6.13. Наконечники для пипеток (от 10 до 200 мкл);
- 6.14. Наконечники для пипеток (от 200 до 1000 мкл);
- 6.15. Колба коническая (500 мл);
- 6.16. Цилиндр мерный (1000 мл);
- 6.17. Перчатки резиновые медицинские;
- 6.18. Спирт этиловый 96%;
- 6.19. Вода бидистиллированная и дистиллированная.

7. ПРОБОПОДГОТОВКА

Способ пробоподготовки пользователем в зависимости от природы биологического образца и содержания в нем ДНК.

7а. Пробоподготовка Ускоренная

Пробоподготовка **Ускоренная** рекомендуется использовать в случае проб с малым содержанием биологического материала (слюна, моча, слеза, смыв из носоглотки, соскоб слизистой и т.д.). Для отбора пробы соскоба слизистой, мазка или смыва от слизистой используется стерильный физраствор объемом 0,5-1,0 мл и одноразовые специальные щеточки или зонды. Плазма, сыворотка крови, спинномозговая жидкость и моча могут быть использованы без разбавления физраствором. Моча для анализа должна быть прозрачной без солевого осадка. В случае появления помутнения мочу рекомендуется термостатировать при 37 °C 15-20 мин. Пробы, готовые к обработке, не должны содержать мукуса (слизи). Для обработки проб мокроты, богатых мукусом, рекомендуется использовать специальный **Муколитический реагент**. При наличии в пробе большого количества биологического материала (соскоб слизистой и т.д.), 100-500 мкл

надосадка, полученного после оседания грубого осадка следует перенести в чистый эппендорф и использовать в пробоподготовке **Ускоренной**.

7а.1 *Подготовка рабочего ЭнзиМикса™*. В пробирку с ЭнзиМиксом™ добавить весь объем (100 мкл) **Растворителя ЭнзиМикса™** и перемешать до полного растворения сухого содержимого, энергично встряхивая и смывая со стенок пробирки. Полное растворение может продлиться до 15 мин.

Далее готовый ЭнзиМикс™ хранить при минус 20 °С в течение года.

7а.2. *Подготовка рабочего ЭкстраГена™*. В пробирку с 1,0 мл ЭкстраГена™ добавить 10 мкл ЭнзиМикс™, перемешать и перенести в холодильник до использования. Готовый рабочий ЭкстраГен™ можно хранить при 2-8 °С в течение недели. При необходимости можно приготовить аналогичным образом рабочий ЭкстраГен™ нужного объема, соблюдая объемные соотношения компонентов.

7а.3. Центрифугировать анализируемые пробы (суспензия биологического материала в физрастворе объемом до 1,0 мл) 2 мин при 10 000 об/мин для сбора клеточного материала.

7а.4. Осторожно, не задевая *еле заметный осадок*, удалить супернатант, используя водоструйный насос.

7а.5. Добавить к осадку от 50 до 200 мкл готового ЭкстраГена™, в зависимости от объема полученного осадка, и суспендировать осадок на вортексе.

***Внимание! ЭкстраГен™ следует отбирать от общего объема при постоянном перемешивании! (7а.2 и 7а.5).**

7а.6. Термостатировать пробирки при 56 °С 30 мин, а затем 10 мин при 100 °С.

7а.7. Центрифугировать пробирки 10-15 с при 10000 об/мин. для сбора конденсата и осаждения несолубилизованного дедриса. Для постановки реакции использовать 10 мкл прозрачного, без гранул ЭкстраГена™, супернатанта. При попадании гранул ЭкстраГена™ в реакционную пробирку происходит ингибирование реакции и приводит к появлению ложноотрицательных результатов.

7б. Пробоподготовка Универсальная

Пробоподготовка **Универсальная** рекомендуется использовать при выделении чистой ДНК из биологических жидкостей и тканей, богатых ДНК (крови, гомогената ткани, клеточной суспензии, соскоба слизистой и т.д.).

7б.1. *Приготовление рабочего раствора Солевого буфера*. Содержимое флакона с **Солевым буфером**, 10 мл, перенести в мерный цилиндр, довести биди стилированной водой до метки 100 мл, затем 96% этанолом до метки 300 мл и перемешать. Полученный раствор следует хранить в герметично закрытой посуде при температуре 2-8 °С в течение одного года.

7б.2. В 1,5 мл пробирку добавить 100 мкл. пробы (кровь, плазма, сыворотка, соскоб слизистой в физрастворе, моча и др.), добавить 300 мкл **Лизирующего реагента** и перемешать, переворачивая пробирку.

10. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

10.1. В пробе из пробирки маркированной (+) должна быть видна специфическая полоса ДНК определенного размера (табл. 2) и соответствующая внутреннему контролю вторая полоса размером 108 пн (Универсальный внутренний контроль, УВК, используется при необходимости).

10.2. В пробирке маркированной (-) специфическая полоса ДНК определенного размера должна отсутствовать, а полоса внутреннего контроля размером 108 пн должна быть видна (в случае использования УВК).

10.3. В пробирке маркированной для анализируемых проб наличие полосы строго на уровне полосы положительного контрольного образца свидетельствует о положительной реакции образца на возбудитель. Полоса внутреннего контроля размером 108 пн также должна быть видна (при использовании УВК).

10.4. **Результаты анализа должны быть отменены:**

а) в случае наличия полосы в отрицательном контрольном образце на уровне полосы положительного контроля (результат контаминации),

б) при отсутствии полосы внутреннего контроля размером 108 пн в анализируемых пробах и контролях (свидетельство наличия ингибирования PCR или же потерь ДНК при пробоподготовке).

10.5. Наличие слабых полос выше или ниже полосы положительного контрольного образца может быть результатом неспецифической амплификации, которые не должны быть приняты во внимание.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

11.1. Все компоненты наборов реагентов **GenPak® DNA PCR test** можно транспортировать при темп. окружающей среды, от минус 20 до 30 °С.

11.1. Все компоненты наборов реагентов следует хранить при температуре от 15-25 °С в течение 1 года со дня выпуска.

11.2. Готовый рабочий раствор протеолитического комплекса **ЭнзиМикс™** следует хранить при минус 20 °С в течение 1 года со дня разведения.

11.3. Готовый рабочий раствор **Солевого буфера** следует хранить в герметично закрытой посуде при 2-8 °С 1 год со дня разведения.

11.4. Готовый рабочий раствор **ТВЕ буфера** для электрофореза можно хранить при температуре 15-25 °С в течение двух месяцев.

11.5. Для получения воспроизводимых результатов необходимо строгое соблюдение объемов добавляемых **PCR Растворителя** и исследуемой ДНК.

9.2. Приготовление агарозного геля. В коническую колбу на 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, 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 (2 мин при "высокой мощности").*

9.3. Подготовка электрофоретической камеры к заливке агарозного геля. Установить крышку с ванночкой на камеру, а платформу для заливки геля поместить в ванночку. Установить гребенку на платформу.

9.4. Расплавленную агарозу охладить приблизительно до 50 °С в теплой воде или на столе при комнатной температуре. Затем в колбу с готовой агарозой внести 15 мкл **этидиума бромид** и осторожно перемешать содержимое колбы равномерными вращательными движениями.

9.5. **Агарозу** налить на платформу. Толщина слоя **агарозы** должна быть около 4 мм.

9.6. После застывания **агарозы** (примерно через 20-25 мин) осторожно, чтобы не порвать карманы, вынуть гребенку, а платформу с застывшим агарозным гелем перенести из ванночки в электрофоретическую камеру.

9.7. Добавить **ТВЕ буфер** в электрофоретическую камеру так, чтобы буфер покрывал агарозный гель слоем приблизительно 2-3 мм.

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

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

9.10. Через 20 - 30 мин (примерно 0,5 см прогона синей краски) электрофоретическую камеру отключить от источника питания, отсоединить провода от камеры, снять крышку с электрофоретической камеры.

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

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

9.12. Осторожно перенести гель на экран УФ трансиллюминатора.

9.13. Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты

76.3. Термостатировать пробирку при 65 °С 5 мин. При наличии несольбуилизованного осадка в пробирке центрифугировать 5-10 с при 5000 об/мин, супернатант перенести в чистую пробирку, а осадок отбросить.

76.4. Добавить в пробирку 20 мкл суспензии сорбента **NucleoS™** (перед использованием **NucleoS™** следует интенсивно встряхнуть на вортексе до полного гомогенного состояния).

76.5. Перемешать пробирку на ротаторе или вручную 5 мин, центрифугировать 10 с при 5000 об/мин и удалить супернатант с помощью водоструйного или аналогичного насоса. Если выделение ДНК проводится из цельной крови или гомогенатов тканей с высоким содержанием гемоглобина, осадок сорбента после центрифугирования и удаления супернатанта следует промыть еще 200 мкл **Лизирующего реагента**. Далее по протоколу.

76.6. Добавить в пробирку 1,0 мл **Солевого буфера** (см. положение 76.1) и интенсивно перемешать.

76.7. Центрифугировать 10 с при 5000 об/мин.

76.8. Удалить осторожно супернатант, не задевая осадок, с помощью насоса.

76.9. К осадку добавить 1,0 мл **Солевого буфера**, тщательно перемешать на вортексе 5-10 с до полного гомогенного состояния.

* *Примечание: Если суспендирование затруднено из-за сильного слипания сорбента, то его необходимо вначале механически разбить осторожным перемешиванием наконечником пипетки, а затем интенсивно перемешать на вортексе.*

76.10. Центрифугировать пробирку 10 с при 10000 об/мин.

76.11. Удалить супернатант, не задевая осадок, с помощью насоса.

76.12. Повторить положение 76.9.- 76.11.

76.13. Посушить осадок при 65 °С 3-5 мин.

76.14. Добавить в пробирку 100 мкл исходного **ЭкстраГена™**.

Внимание! ЭкстраГен™ следует отбирать от общего объема при постоянном перемешивании.

76.15. Суспендировать содержимое пробирки на вортексе 5-10 с до гомогенного состояния, после чего термостатировать 5 мин при 65 °С. Еще раз суспендировать содержимое пробирки на вортексе перед центрифугированием.

76.16. Центрифугировать пробирку 1 мин при максимальных оборотах (10000 об/мин).

76.17. Перенести чистый супернатант с ДНК (без гранул **ЭкстраГена™** и

NucleoSTM) в пробирку для хранения или сразу использовать для постановки PCR. При попадании гранул *ЭкстраГенаTM* в реакционную пробирку происходит ингибирование реакции, что приводит к появлению ложноотрицательных результатов. Хранить при температуре минус 20 °С.

7в. Пробоподготовка Магнитная

Магнитная пробоподготовка рекомендуется при выделении чистой ДНК из различных биологических проб с высоким содержанием ДНК.

7.1.в *Приготовление рабочего раствора Солевого буфера.* 10 мл 10-кратного **Солевого буфера** перенести в мерный цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 100 мл и 96% этиловым спиртом до метки 300 мл и перемешать. Готовый рабочий раствор **Солевого буфера** следует хранить в герметично закрытой посуде при температуре 2-8 °С.

7.2.в В пробирку объемом 1,5 мл внести 100 мкл исследуемой жидкости, добавить 300 мкл Лизирующего реагента и 20 мкл суспензии сорбента Magnetic (перед использованием Magnetic следует интенсивно перемешать на вортексе до гомогенной суспензии).

7.3.в Пробирку поместить на ротатор или перемешивать вручную 5 мин.

7.4.в Добавить в пробирку 1,0 мл рабочего раствора Солевого буфера (см. пункт 7.1) и перемешать содержимое пробирки до гомогенного состояния.

7.5.в Установить пробирку в магнитный штатив на 15-20 с.

Осторожно, не задевая осевший на стенку сорбент, удалить прозрачный супернатант с помощью насоса или пипетки. Если выделение ДНК проводится из цельной крови или гомогенатов тканей с высоким содержанием гемоглобина, осадок сорбента после разделения на магнитном штативе и удаления супернатанта следует промыть еще раз 200 мкл **Лизирующего реагента**. Далее по протоколу.

7.6.в Перенести пробирку в обычный штатив.

7.7.в Добавить в пробирку 1,0 мл рабочего раствора Солевого буфера и перемешать содержимое пробирки до гомогенного состояния.

7.8.в Установить пробирку в магнитный штатив на 15-20 с.

7.9.в Осторожно удалить прозрачную часть смеси.

7.10.в Повторить пункты 7.7.-7.9.

7.11.в Посушить осадок при температуре 65 °С в течение 2-3 мин.

7.12.в В эту же пробирку внести не менее 100 мкл *ЭкстраГенаTM*.

***Внимание! ЭкстраГенTM следует отбирать от общего объема при постоянном перемешивании!**

7.13.в Суспендировать содержимое пробирки на вортексе до получения гомогенной суспензии, после чего термостатировать 5 мин при 65 °С.

7.14.в Еще раз суспендировать содержимое пробирки на вортексе.

7.15.в Центрифугировать пробирку при 5000 об/мин. 1 мин.

7.16.в Перенести супернатант с ДНК в чистую пробирку

7.17.в Выделенную ДНК хранить при температуре минус 20 °С

8. ПОСТАНОВКА PCR.

8.1. Достать нужное количество бесцветных пробирок **МастерМикса** для анализа проб, одну пробирку синего цвета (-) **контроля** для амплификации отрицательного контроля и одну пробирку красного цвета (+) **контроля** для амплификации положительного контроля. Промаркировать соответствующим образом отобранные пробирки.

8.2. Добавить во все пробирки, в том числе в (-) и (+) **контроли**, по 10 мкл **ПЦР Растворителя**. Сбросить использованный наконечник с пипетки.

8.3. Добавить в бесцветные пробирки **МастерМикса** по 10 мкл готовой для анализа ДНК проб (см. Пробоподготовку 7а.7., 7б.17 или 7в.17.).

8.4. Добавить в синюю пробирку (-) **контроля** и красную пробирку (+) **контроля** по 10 мкл бидистиллированной воды. Растворение содержимого пробирки не обязательно.

8.5. Добавить во все пробирки по капле **Масла** (не менее 20 мкл).

***Внимание: 1. Для предотвращения контаминации следует строго соблюдать последовательность внесения образцов: сначала в анализируемые пробы, затем в (-) контроль и в конце в (+) контроль. Обязательно менять наконечник. 2. При работе с анализируемыми пробами рекомендуется использовать специальные наконечники с антиаэрозольными фильтрами.**

8.6. Провести амплификацию по следующей программе.

Таблица 1

№№ Програм.	Контроль температуры block, матрица		Активное регулирование температуры			
			Внутри пробирки, (tube, точный)		Рассчитанное 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 с	95 °С	20 с	95 °С	20 с	95 °С
	40 с	58 °С	20 с	58 °С	20 с	58 °С
	60 с	74 °С	40 с	74 °С	40 с	74 °С
		45 циклов		45 циклов		45 циклов
3	120 с	74 °С	120 с	74 °С	120 с	74 °С
		1 цикл		1 цикл		1 цикл

* в зависимости от модели используемого термоциклера, рекомендуется оптимизировать температуру отжига в пределах ± 2 °С от базового 58 °С.

8.7. После окончания амплификации все пробирки перенести в комнату для проведения детекции ДНК.

9. ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

9.1. *Приготовление рабочего раствора буфера для электрофореза (ТВЕ).*

В мерную колбу (цилиндр) на 1000 мл внести содержимое флакона с буфером для электрофореза (ТВЕ), довести до метки дистиллированной во-

дой и перемешать до полного растворения порошка. **ТВЕ буфер** используется также и для приготовления агарозного геля. Готовый **ТВЕ буфер** может храниться при комнатной температуре в течение 2 месяцев.