



Инструкция по применению набора реагентов расположена на сайте [www.pcr.ru](http://www.pcr.ru) или [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)



## Краткое руководство

### набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® F2/F5-SNP-FL

Форма 1: **REF** S-3451-1

Форма 2: **REF** S-3452-1-4



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора,  
Российская Федерация, 111123, город  
Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



**VER** 24.10.18

**ВНИМАНИЕ!** Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

#### ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

##### Комплекты для экстракции:

– «РИБО-преп» и другие комплекты, рекомендованные Изготовителем.

**Контроли:** 1 отрицательный (ОК) контроль экстракции.

Объем исследуемого образца, контроля и элюции	
<b>При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:</b>	
Исследуемый образец	осадок, полученный после предобработки гемолитиком 100 мкл цельной венозной крови (порядок подготовки исследуемого материала см. в инструкции)
ОКО	100 мкл в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
<b>Элюция</b>	
все образцы	50 мкл в каждую пробирку

#### ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

**Общий объем реакционной смеси:** 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

**Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов три положительных контроля ПЦР (K1+, K2+ и K3+), отрицательный контроль ПЦР (K-), отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL F2/F5	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	5*(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5*(N+K+1)	

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

- Отобрать необходимое (трехкратное) количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб:

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов
К+ ДНК 1	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K1+)
К+ ДНК 2	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K2+)
К+ ДНК 3	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K3+)
К-	в пробирку для отрицательного контроля ПЦР (K-)
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для отрицательного контроля экстракции (ОК)

### **ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-L**

**Общий объем реакционной смеси:** 25 мкл, включая объем пробы ДНК (25 мкл).

**Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов три положительных контроля ПЦР (K1+, K2+ и K3+), отрицательный контроль ПЦР (K-), отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью-F2/F5-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов
10 мкл K1+ и 15 мкл K-	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K1+)
10 мкл K2+ и 15 мкл K-	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K2+)
10 мкл K3+ и 15 мкл K-	в пробирку для положительного контроля ПЦР (K3+)
К-	в пробирку для отрицательного контроля ПЦР (K-)
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для отрицательного контроля экстракции (ОК)

**ВНИМАНИЕ!** Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

### **АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	<b>FAM, JOE, ROX, Cy5</b>	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вихрексе.

**ВНИМАНИЕ!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

## **АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализ результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Ген	rs	Канал для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
F2	rs1799963	аллель G	аллель A	–	–
F5	rs6025	–	–	аллель G	аллель A

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла ( $C_t$ ).

**ВНИМАНИЕ!** К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки, особенности установки пороговой линии и граничные значения  $C_t$  для приборов роторного и планшетного типа, необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Принципы интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.