

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ
ДНК ПАТОГЕННЫХ ВИДОВ LEPTOSPIRA
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Ветскрин. Лептоспироз

2020



ЭТАП ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Состав комплекта реагентов для выделения ДНК «ДНК-сорбент-ВЕТ»

Формат	Реактив	Количество
«ДНК-сорбент-ВЕТ» 50 определений	Раствор 1 (лизирующий)	23 мл
	Раствор 2 (промывочный)	20 мл
	Раствор 3 (промывочный)	50 мл
	Раствор 4 (промывочный)	20 мл
	Раствор Т	0,5 мл
	Раствор S	15 мл
	Сорбент	2 пробирки по 1 мл
	Раствор для элюции	3 пробирки по 2 мл
	Экзогенный внутренний контроль (ЭВК)	0,5 мл

ВИДЫ БИОМАТЕРИАЛА

Биоматериал	Взятие образца для анализа	Хранение, транспортировка
Моча	собрать порцию мочи в количестве 20 мл в сухой стерильный флакон с плотно завинчивающейся крышкой	моча для исследования должна быть свежей (<i>не охлаждать и не замораживать!</i>); до получения осадка исходный материал должен быть доставлен в лабораторию как можно быстрее.
Ликвор, синовиальная жидкость	отобрать 1-1,5 мл исходного материала в сухую стерильную пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл	материал для исследования должен быть свежим (<i>не охлаждать и не замораживать!</i>).
Плазма или сыворотка крови	500 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 50 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия. ГЕПАРИН ИСПОЛЬЗОВАТЬ НЕЛЬЗЯ!) – для получения плазмы, либо в пустую пробирку – для получения сыворотки. При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с фиолетовой крышкой (с	неохлажденные образцы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК; хранить при +4...+8°C не более 1 суток; не замораживать!

При использовании вакутейнера без антикоагулянта для получения сыворотки пробирку с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37°C на 15 мин. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной. Полученную сыворотку использовать для выделения ДНК. Сыворотку крови можно хранить при температуре не выше минус 18°C не более 1 месяца.

➤ **Образцы тканей** (костный мозг, мышцы, лимфоузлы, легкие, почки):

- Стерильным инструментом отобрать образец материала размером не более **5 x 5 мм** и поместить каждый образец в отдельную пробирку на 1,5 мл.
- Добавить к образцу **300 мкл раствора S**.
- Перемешать на вортексе 5-10 сек. Осадить капли с крышки пробирки коротким центрифугированием.
- Прогреть при **70°C** в течение **10 минут**.
- Отцентрифугировать **1 минуту** при **10 тыс.об./мин.**
- Перенести супернатант (надосадок) в чистую 1,5 мл пробирку и продолжить выделение с п.2.

➤ **Цельная кровь:**

- Предварительно перемешать пробирку с цельной кровью на вортексе 5-10 сек. Осадить капли с крышки пробирки коротким центрифугированием.
- В отдельную пробирку на 1,5 мл отобрать **50 мкл цельной крови**.
- Добавить к образцу **300 мкл раствора S**.
- Добавить к образцу **10 мкл раствора T**.
- Перемешать на вортексе 5-10 сек. Осадить капли с крышки пробирки коротким центрифугированием.
- Прогреть при **95°C** в течение **10 минут**.
- Отцентрифугировать **1 минуту** при **максимальных оборотах** (13-14 тыс.об/мин).
- Перенести супернатант (надосадок) в чистую 1,5 мл пробирку и продолжить выделение с п.2.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

За 10-15 минут до начала работы растворы для выделения ДНК 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8 градусов) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

1. В пробирку на 1,5 мл внести по **100 мкл образца**.
2. Внести в каждую пробирку **450 мкл 1-го раствора**.
3. Добавить в каждую пробирку по **10 мкл ЭВК (ДЛЯ НАБОРОВ С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ЭВК-ЭФ ИЗ КОМПЛЕКТА ПЦР НАБОРА)**.
4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**.
5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на **5 минут при комнатной температуре**.
6. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при **10 тыс.об/мин** в течение **30 секунд** на микроцентрифуге и удалить надосадоочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.
7. Добавить в пробирки по **400 мкл 2-го раствора**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при **10 тыс.об/мин** в течение **30 секунд** на микроцентрифуге и удалить надосадоочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

Количество пробирок	5	10	15	20
ПЦР-буфер-1, мкл (17,5 мкл/пробирку)	87,5	175	262,5	350
Реакционной смеси, мкл (2,5 мкл/пробирку)	12,5	25	37,5	50
Тaq-полимераза, мкл (0,2 мкл/пробирку)	1	2	3	4

4. Внести в приготовленные пробирки по **20 мкл** приготовленной рабочей смеси.
5. Добавить наконечником с аэрозольным фильтром во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.
6. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по **5 мкл**:
 - а) в пробирку **отрицательного контрольного образца (ОКО)** – ПЦР-буфер-1;
 - б) в пробирки **исследуемых образцов** – исследуемые образцы ДНК;
 - в) в пробирку **положительного контрольного образца (ПКО)** – ПКО из комплекта набора.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

7. Пробирки плотно закрыть и центрифугировать в течение 15 сек на микроцентрифуге-вортесе.
8. Перенести пробирки в прогретый до температуры **+94°C** амплификатор и провести амплификацию по следующей программе:

«терцик» («ДНК-Технология», Россия,
или эквивалентный)

+94°C	пауза	
+94°C	1 мин 30 сек	1 цикл
+94°C	10 сек	40 циклов
+64°C	10 сек	
+72°C	40 сек	

9. Детекция продуктов амплификации осуществляется с помощью разделения продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в **2% агарозном геле**.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

428 п.н. – патогенные виды лептоспир;

938 п.н. - сигнал экзогенного внутреннего контроля (ЭВК-ЭФ), вносится в образец на стадии выделения ДНК.

	Специфическая полоса 428 п.н. (патогенные <i>Leptospira</i>)	Полоса ЭВК-ЭФ 938 п.н.	Результат
--	---	----------------------------------	-----------

ПКО	есть	есть	Специфическая реакция прошла
	нет	нет\есть	Специфическая реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО	нет	нет	Специфическая контаминация отсутствует
	есть	нет\есть	Специфическая контаминация ДНК патогенных видов лептоспир. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	нет	есть	Контаминация ЭВК-ЭФ повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
Анализируемый образец	нет	есть	ОТСУТСТВИЕ ДНК патогенных видов лептоспир.
	есть	нет\есть	ПРИСУТСТВИЕ ДНК патогенных видов лептоспир.
	нет	нет	Ингибирование. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца с этапа выделения. В случае неудовлетворительного результата рекомендуется сделать повторный пробозабор материала.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Комплект реагентов для выделения ДНК ДНК-сорбент-ВЕТ хранится при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности. Срок годности – 12 месяцев. Допускается хранение и транспортировка при температуре +18...+25°С не более 7 дней. При длительном хранении раствор 1 при температуре +2...+8°С может кристаллизоваться, в таком случае перед использованием его необходимо прогреть при 60°С до полного растворения кристаллов.
2. **Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации ДНК** хранится при температуре -20...-18 °С в течение всего срока годности. Срок годности – 12 месяцев. Допускается хранение и транспортировка при температуре +2...+8 °С не более 5 дней.
3. Комплект реагентов для электрофоретической детекции хранится при температуре +18...+25 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности – 12 месяцев. Допускается хранение и транспортировка при температуре +2...+25 °С.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению. Комплекты реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

По всем вопросам обращайтесь в ООО НПФ "ЛИТЕХ".
Почтовый адрес: 107023 Москва, ул. Малая Семёновская, д. 3А, стр.2;
телефон/факс: (495) 258-39-47; email: info@lytech.ru