



КвантумДНК

Набор реагентов для количественного определения концентрации ДНК и качественной оценки наличия ингибиторов ПЦР в препарате ДНК человека методом ПЦР-РВ

Для амплификатора CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Номера по каталогу

AS001

AS002

AS003

Инструкция по применению

Оглавление

1. Сокращения и определения.....	3
2. Название, варианты исполнения	4
3. Назначение, область применения	4
4. Состав, форма выпуска	5
5. Принцип действия.....	6
6. Биологический материал.....	8
7. Основные характеристики.....	8
8. Количество определений	8
9. Ограничения	9
10. Меры при изменении характеристик набора.....	9
11. Условия транспортирования, хранения и использования.....	9
12. Срок годности	10
13. Гарантии изготовителя.....	10
14. Порядок подачи рекламаций.....	10
15. Меры предосторожности	11
16. Требования к персоналу.....	12
17. Необходимые дополнительные материалы и реагенты, лабораторная посуда, оборудование	12
18. Протокол	13
19. Анализ результатов.....	16
20. Утилизация (уничтожение) и дезинфекция	20
Графические символы	22

1. Сокращения и определения

Эффективная концентрация — концентрация ДНК, пригодной для ПЦР.

Измерительная ПЦР — ПЦР, выполняемая с помощью набора реагентов «КвантумДНК», с целью количественного определения эффективной концентрации ДНК человека в исследуемом образце (препарате ДНК человека).

Целевая ПЦР — ПЦР, перед выполнением которой проводится оценка исследуемых образцов (препаратов ДНК человека) с целью отсеять образцы с недостаточной концентрацией ДНК или содержащие ингибиторы ПЦР.

ВК — внутренний контроль, включенный во все реакции набора. Необходим для контроля за ходом амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью, позволяет качественно определить наличие ингибиторов ПЦР, а также исключить ложноотрицательные результаты измерений.

Стандарты ДНК (Стандарт) — контрольные препараты ДНК человека без ингибиторов ПЦР с известной концентрацией ДНК, используемые для построения калибровочного графика.

НТС — контрольный образец без добавления матрицы ДНК (No Template Control) для измерительной реакции. Необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них человеческой ДНК вследствие контаминации.

Пороговый уровень (Threshold) — уровень, соответствующий середине экспоненциальной фазы кривых накопления продукта измерительной реакции. Значение порогового уровня одинаково для всех мишеней в одной поставке.

Пороговый цикл (C_t , C_q) — цикл, на котором кривая флуоресценции пересекает пороговый уровень.

ПО — программное обеспечение

GAPDH — ген человека, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (Glyceraldehyde-3-PhosphateDehydrogenase).

Предел обнаружения (LoQ, Limit of Detection) — минимальная эффективная концентрация ДНК человека, которая может быть обнаружена при использовании наборов «КвантумДНК» с доверительной вероятностью 95%.

2. Название, варианты исполнения

Равноправно заменяя друг друга, используются полное и краткое названия набора реагентов и вариантов исполнения.

Полное название: «КвантумДНК набор реагентов для количественного определения концентрации ДНК и качественной оценки наличия ингибиторов ПЦР в препарате ДНК человека методом ПЦР-РВ».

Краткое название: «КвантумДНК»

Набор реагентов «КвантумДНК» выпускается в 3 вариантах исполнения:

1. «КвантумДНК-91»
2. «КвантумДНК-156»
3. «КвантумДНК-211»

3. Назначение, область применения

Для применения только в научно-исследовательских целях.

Не для применения в медицине и ветеринарии.

Набор реагентов «КвантумДНК» предназначен для количественного определения концентрации ДНК и качественного определения наличия ингибиторов ПЦР в препарате ДНК человека методом ПЦР-РВ.

Оценка препарата ДНК человека с помощью набора «КвантумДНК» позволяет определить его пригодность для целевой ПЦР (см. табл. 1):

- по эффективной концентрации ДНК с учетом длины ампликона целевой реакции;
- по наличию ингибиторов ПЦР.

Таблица 1 – назначение набора «КвантумДНК»

Вариант исполнения	Количественное определение эффективной концентрации ДНК с длиной фрагмента:	Качественная оценка наличия ингибиторов ПЦР
КвантумДНК-91	от 91 п.о.	Предусмотрено
КвантумДНК-156	от 156 п.о.	Предусмотрено
КвантумДНК-211	от 211 п.о.	Предусмотрено

Рекомендуется для оценки ДНК, выделенной из срезов с FFPE-блоков и из другого биоматериала, в котором могла произойти частичная деградация ДНК.

Применение «КвантумДНК» перед выполнением целевой ПЦР повышает надежность, воспроизводимость результатов дальнейших исследований и снижает вероятность появления ложноотрицательных результатов, что позволяет экономить время, реагенты и исходный препарат ДНК.

Набор производится по ТУ 9398-002-11248074-2017, предназначен для научно-исследовательских целей.

4. Состав, форма выпуска

В состав набора входят следующие компоненты:

Компонент	КвантумДНК-91	КвантумДНК-156	КвантумДНК-211
5X ПЦР-смесь	1.2 мл 2 пробирки по 0.6 мл	1.2 мл 2 пробирки по 0.6 мл	1.2 мл 2 пробирки по 0.6 мл
5X Реагент-91	1.2 мл 1 пробирка	–	–
5X Реагент-156	–	1.2 мл 1 пробирка	–
5X Реагент-211	–	–	1.2 мл 1 пробирка
Стандарт 1 (0.5 нг/мкл)	0.1 мл 1 пробирка	0.1 мл 1 пробирка	0.1 мл 1 пробирка
Стандарт 2 (3.5 нг/мкл)	0.1 мл 1 пробирка	0.1 мл 1 пробирка	0.1 мл 1 пробирка
Стандарт 3 (25 нг/мкл)	0.1 мл 1 пробирка	0.1 мл 1 пробирка	0.1 мл 1 пробирка

5X ПЦР-смесь:

Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.

5X Реагент-91:

Жидкость прозрачная бледно-розовая, не вязкая.

5X Реагент-156:

Жидкость прозрачная бледно-розовая, не вязкая.

5X Реагент-211:

Жидкость прозрачная бледно-розовая, не вязкая.

Стандарт 1 (0.5 нг/мкл):

Жидкость прозрачная бесцветная, не вязкая.

Стандарт 2 (3.5 нг/мкл):

Жидкость прозрачная бесцветная, не вязкая.

Стандарт 3 (25 нг/мкл):

Жидкость прозрачная бесцветная, не вязкая.

5. Принцип действия

В основе метода лежит ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием линейных разрушаемых флуоресцентных зондов. Для количественного определения эффективной концентрации ДНК и качественного определения наличия ингибиторов ПЦР в каждой пробирке одновременно проходят две реакции, детектируемые по разным каналам: измерительная реакция – по каналу FAM, реакция внутреннего контроля – по каналу HEX.

С помощью измерительной ПЦР определяется эффективная концентрация ДНК. В измерительной реакции используются специфические праймеры и флуоресцентный зонд, комплементарные однокопийному участку в гене человека *GAPDH* («5X Реагент-91» или «5X Реагент-156» или «5X Реагент-211»; для реакции также необходима «5X ПЦР-смесь»). В зависимости от расположения праймеров в результате ПЦР получаются ампликоны разной длины: 91, 156 и 211 п.о. (см. рис. 1).

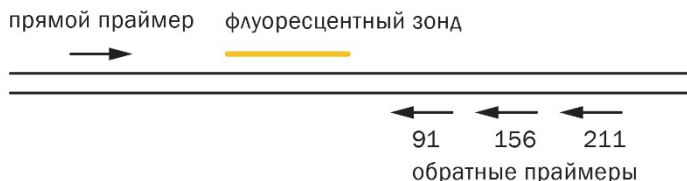


Рисунок 1 – схема расположения праймеров и зонда.

Измерение эффективной концентрации ДНК производится относительно Стандартов ДНК с известной концентрацией: «Стандарт 1» – 0.5 нг/мкл, «Стандарт 2» – 3.5 нг/мкл, «Стандарт 3» – 25 нг/мкл. На основе значений *Ct* Стандартов ДНК по каналу FAM программное обеспечение амплификатора строит калибровочные графики, по которым рассчитывает эффективную концентрацию ДНК в исследуемых образцах (см. рис. 2).

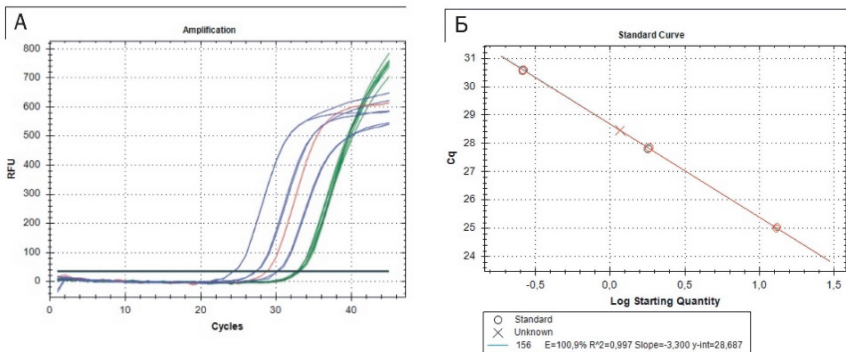


Рисунок 2 – анализ исследуемого образца.

А. Кривые флуоресценции для Стандартов ДНК (25, 3.5 и 0.5 нг/мкл) и исследуемого образца по каналам FAM и HEX. Стандарты обозначены синим цветом, исследуемый образец — красным, внутренний контроль всех образцов — зеленым.

Б. Калибровочный график с результатом измерения концентрации образца ДНК. ○ — Стандарты ДНК, × — исследуемый образец.

С помощью реакции внутреннего контроля проводится качественное определение наличия ингибиторов ПЦР в образце. Система внутреннего контроля представляет собой искусственную матрицу ДНК (293 п.о.), специфические праймеры и детектирующий зонд, комплементарные к этой матрице, которые входят в состав реакционной смеси («5X Реагент-91», «5X Реагент-156», «5X Реагент-211»).

Присутствие ингибиторов ПЦР определяется сопоставлением значений *Ct* по каналу HEX в реакциях с исследуемыми образцами и Стандартами ДНК. Если значение *Ct* в реакции с образцом превышает максимальное значение *Ct* Стандартов ДНК на 3 цикла и более, значит, образцы содержат ингибиторы ПЦР.

Каждое определение концентрации ДНК для одиночного исследуемого образца или для группы одновременно исследуемых образцов требует использования четырех контрольных образцов: трех Стандартов ДНК («Стандарт 1», «Стандарт 2», «Стандарт 3») и образца без матрицы ДНК (NTC).

Анализ каждого образца выполняется в двух технических повторностях.

6. Биологический материал

Препарат ДНК человека (раствор ДНК в воде, ТЕ-буфере или буфере для элюции).

7. Основные характеристики

Количественное определение эффективной концентрации ДНК

Характеристика	Значение
Предел обнаружения ДНК человека, LoD	0.03 нг/мкл
Диапазон измерения	от 0.1 до 300 нг/мкл, отклонение от линейности не более 15%; случайная ошибка на всем диапазоне не более 20%

Качественное определение наличия ингибиторов ПЦР

Характеристика	Значение
Аналитическая чувствительность (нижний порог)	EDTA – от 1.2 мМ Гепарин – от 0.15 ед/мл Гуанидин гидрохлорид – от 80 мМ Этанол – от 3%
Аналитическая специфичность	Регистрация наличия ингибиторов ПЦР при превышении порога чувствительности Отсутствие регистрации ингибиторов ПЦР в контрольных образцах (Стандарты ДНК, NTC)

8. Количество определений

Набор реагентов рассчитан на 200 реакций, что соответствует 20- 88 исследуемым образцам, исключая контрольные образцы.

Максимальное количество исследуемых образцов достигается при полной загрузке 96-луночного ПЦР-амплификатора.

Минимальное количество исследуемых образцов рассчитано исходя из определения по одному исследуемому образцу за один запуск ПЦР-амплификатора.

9. Ограничения

9.1 Совместимость с ПЦР-амплификаторами

CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот (амплификатор ПЦР в режиме реального времени) CFX96 (модель 1000, Bio-Rad Laboratories, Inc., США, ФСЗ 2008/03399).

9.2 Биоматериал, измерения

ВНИМАНИЕ!

ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДНК РАЗБРОС ЗНАЧЕНИЙ ЭФФЕКТИВНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ, ПОЛУЧЕННЫХ В ПОВТОРНЫХ ИЗМЕРЕНИЯХ, МОЖЕТ БЫТЬ ВЫШЕ, ЧЕМ ПРИ РАБОТЕ С ОБРАЗЦАМИ ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ ДНК.

ВНИМАНИЕ!

ЗНАЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК МОЖЕТ РАСХОДИТЬСЯ С ДАННЫМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК, Т.К. ПОСЛЕДНИЕ НЕ УЧИТЫВАЮТ ДЛИНУ ФРАГМЕНТОВ ДНК, ИХ ХИМИЧЕСКУЮ МОДИФИКАЦИЮ И НАЛИЧИЕ ИНГИБИТОРОВ ПЦР.

10. Меры при изменении характеристик набора

Необходимо исключить неудовлетворительное качество биоматериала, ошибку измерения, ошибку выполнения протокола, нарушение условий транспортирования и хранения. Если все указанные факторы исключены, необходимо обратиться в службу технической поддержки изготовителя.

11. Условия транспортирования, хранения и использования

11.1 Хранение

Температурный режим хранения для всех компонентов набора реагентов: от -25 до -15 °С.

11.2 Транспортирование

Набор реагентов «КвантумДНК» транспортировать всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта:

- в пенопластовых контейнерах с гелевыми хладагентами при температуре от 0 °С до +8 °С в течение 5 суток;
- в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 10 суток;
- более длительное транспортирование выполнять при температуре хранения набора реагентов.

Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, использованию не подлежит.

11.3 Использование

Специального режима использования не требуется.

По окончании использования поместить набор реагентов на хранение с соблюдением соответствующих условий и температурных режимов.

12. Срок годности

12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортирования и хранения.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

13. Гарантии изготовителя

Предприятие-изготовитель ООО «НОМОТЕК» гарантирует:

- соответствие набора реагентов требованиям ТУ 9398-002-11248074-2017 при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования;
- срок годности набора реагентов – 12 месяцев с даты изготовления, указанной на этикетке, при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования.

14. Порядок подачи рекламаций

Контроль качества набора реагентов осуществляется ОТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 9398-002-11248074-2017.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться:

- ООО «НОМОТЕК» 117997 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;
- md-support@nomotech.ru — техническая поддержка.

15. Меры предосторожности

15.1 Общие меры предосторожности

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению. **Использовать только для научно-исследовательских целей.**

Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.

Ключевой мерой предосторожности при работе с набором является соблюдение требований, изложенных в ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности.», утвержденном Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г.

Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.

Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

15.2 Меры предотвращения контаминации

Все этапы работы необходимо проводить в отдельных помещениях с изолированной системой вентиляции или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами пипеток, халатами, всеми необходимыми расходными материалами и оборудованием:

- Зона № 1 для работы с геномной ДНК (выделение ДНК, пробоподготовка);
- Зона № 2 «чистая» для подготовки ПЦР (изолированная от источника ДНК);
- Зона № 3 для внесения ДНК;
- Зона № 4 для манипуляций с ПЦР-продуктом.

ПЦР-амплификаторы не должны располагаться в зонах № 1 — № 3.

Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

Необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

Работать только в одноразовых неопудренных перчатках и в спецодежде.

Приготовление реакционной смеси и выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах.

Все лабораторное оборудование, в том числе автоматические дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты и пр., а также растворы реагентов не должны перемещаться из одной зоны в другую.

Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

16. Требования к персоналу

Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться специалистами, имеющими достаточную квалификацию.

17. Необходимые дополнительные материалы и реагенты, лабораторная посуда, оборудование

- термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот (амплификатор ПЦР в режиме реального времени) CFX96 (модель 1000, Bio-Rad Laboratories, Inc., США, ФСЗ 2008/03399);
- твердотельный термостат;
- настольная микроцентрифуга для пробирок;
- настольная микроцентрифуга для стрипов и пробирок для ПЦР;
- встряхиватель для пробирок (вортекс);
- ПЦР-боксы;
- автоматические дозаторы на 10, 200 и 1000 мкл;
- одноразовые неопудренные перчатки;
- наконечники для дозаторов с гидрофобным фильтром на 10, 200 и 1000 мкл;
- микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл;
- микропробирки для ПЦР, совместимые с амплификатором CFX96;
- вода деионизованная.

18. Протокол

Справочная информация:

- длительность ПЦР 1 час 40 минут,
- время ручной работы от 30 минут.

18.1 Рассчитать необходимый объем компонентов ПЦР, входящих в состав ОБЩЕЙ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ. В таблице 2 указан расчет для N исследуемых образцов с учетом того, что:

- для каждого измерения необходимо использовать контрольный образец без матрицы ДНК (НТС) и образцы, используемые для построения калибровочного графика: «Стандарт 1», «Стандарт 2», «Стандарт 3»;
- все реакции необходимо выполнить в двух технических повторностях.

Для каждого используемого «5X Реагента» (-91, -156, -211) готовится отдельная ОБЩАЯ РЕАКЦИОННАЯ СМЕСЬ.

Таблица 2 – расчет объема компонентов ПЦР для общей реакционной смеси

Компонент ПЦР	Объем (мкл) для N исследуемых образцов (в 2 технических повторностях)
Вода деионизованная	$15 \times 2 \times (N + 4)$
5X ПЦР-смесь	$5.8 \times 2 \times (N + 4)$
5X Реагент (-91, -156 или -211)	$5.8 \times 2 \times (N + 4)$

18.2 В зоне № 2 при комнатной температуре разморозить пробирки с компонентами «5X ПЦР-смесь» и «5X Реагент» (-91, -156, -211), тщательно перемешать содержимое пробирок 4-х кратным переворачиванием и встряхиванием на вортексе в течение 3 с, после чего центрифугировать в микроцентрифуге в течение 5 с для сбрасывания капель. Поместить пробирки с компонентами в рабочий штатив.

18.3 Приготовить ОБЩУЮ РЕАКЦИОННУЮ СМЕСЬ (см. табл. 2) в пробирке объемом 1.5 мл.

18.4 Тщательно перемешать ОБЩУЮ РЕАКЦИОННУЮ СМЕСЬ пипетированием тремя четвертями объема общей смеси, сбросить капли со стенок пробирок в микроцентрифуге в течение 5 с.

18.5 Перенести пробирку с общей реакционной смесью в зону № 3.

18.6 В зоне № 3 подготовить исследуемые образцы и «Стандарт 1», «Стандарт 2», «Стандарт 3».

ВНИМАНИЕ!

ПОСЛЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ СТАНДАРТЫ ДНК И ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ ДНК НЕОБХОДИМО ПРОГРЕТЬ 2 МИН ПРИ +50 °С, ПЕРЕМЕШАТЬ НА ВОРТЕКСЕ В ТЕЧЕНИЕ 2 С, ПОСЛЕ ЧЕГО СБРОСИТЬ КАПЛИ В МИКРОЦЕНТРИФУГЕ В ТЕЧЕНИЕ 5 С.

Перед добавлением в реакционную смесь дать образцам остыть до комнатной температуры.

В случае, если исследуемый образец выделен в объеме равном или меньшем 20 мкл, отобрать 2 мкл предварительно прогретого образца ДНК, добавить 8 мкл воды для ПЦР, перемешать четырехкратным пипетированием объемом 7 мкл. Для измерительной реакции использовать разведенный образец, при анализе результатов учесть пятикратное разведение образца.

18.7 Подготовить пробирки для ПЦР по количеству реакций ($2N + 8$, где N – количество исследуемых образцов), промаркировать:

- 2 пробирки: «НТС» – для НТС;
- 2 пробирки: «С-1» – для «Стандарт 1»;
- 2 пробирки: «С-2» – для «Стандарт 2»;
- 2 пробирки: «С-3» – для «Стандарт 3»;
- $2N$ пробирок: нанести на каждую пару пробирок маркировку, соответствующую идентификатору исследуемого образца.

Не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. На пробирки маркировку можно наносить на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.

18.8 Внести по 23 мкл ОБЩЕЙ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ во все пробирки для ПЦР.

18.9 Внести по 2 мкл «Стандарт 1» в пробирки с соответствующей маркировкой «С-1», предназначенные для «Стандарт 1». Выполнить аналогично для «Стандарт 2» и «Стандарт 3». Промыть наконечник трехкратным пипетированием для полного переноса ДНК в раствор. Сразу после добавления ДНК закрывать крышки пробирок.

18.10 Внести по 2 мкл исследуемого образца (исследуемый препарат ДНК человека) добавить в пробирки для ПЦР с соответствующей маркировкой, предназначенные для данного образца. Промыть наконечник

трехкратным пипетированием для полного переноса ДНК в раствор. Выполнить аналогично для всех исследуемых образцов. Сразу после добавления ДНК закрывать крышки пробирок.

18.11 Добавить по 2 мкл воды в пробирки, предназначенные для НТС. Закрывать крышки пробирок.

18.12 Центрифугировать пробирки в центрифуге для стрипов для сброса капель в течение 30 с.

18.13 Установить пробирки в блок амплификатора.

18.14 В управляющей программе амплификатора, согласно инструкции изготовителя, выбрать параметры:

- снятие кривой плавления не требуется;
- считывание флуоресценции в каналах FAM и HEX;
- объем реакционной смеси — 25 мкл;
- программа амплификации:

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация (Hold)	95	3 мин	–
45 циклов (Cycling)	95	30 с	–
	60	30 с	FAM, HEX
	72	30 с	–

- для образцов «Стандарт 1», «Стандарт 2», «Стандарт 3» установить тип образца «Стандарт» («Standard»), по каналу FAM ввести значения концентрации ДНК соответственно: 0.5, 3.5 и 25 нг/мкл.
- для всех реакций по каналу FAM обозначить «Мишень» (Target) в соответствии с использованным «5X Реагентом»: 91, 156 или 211, соответственно.

Шаблоны программы ПЦР и разметки плашки –

<http://www.nomotech.ru/products/quantumDNA.html>

Пошаговая инструкция программирования амплификатора перед запуском ПЦР также находится на сайте и в отдельном приложении.

19. Анализ результатов

Пошаговая инструкция анализа результатов находится на сайте <http://www.nomotech.ru/products/quantumDNA.html> и в отдельном приложении.

19.1 Первичная обработка данных

После окончания ПЦР в программном обеспечении амплификатора установите параметры:

- базовая линия – задать значение с 10 цикла по цикл, автоматически определяемый ПО амплификатора;
- режим анализа (Analysis Mode) – выбрать режим «Мишень» (Target);
- Threshold – выставить по каналу FAM для каждой мишени (91, 156, 211 п.о.) на одном и том же уровне, соответствующем середине экспоненциальной фазы кривых накопления продукта ПЦР (см. рис. 3). По каналу HEX задать значение порогового уровня, равное значению, установленному в канале FAM.

Показателем накопления продукта реакции является пороговый цикл (C_t , Threshold Cycle). Для каждого образца ПО автоматически определяет C_t измерительной реакции в канале FAM и C_t реакции внутреннего контроля в канале HEX.

ПО амплификатора CFX96 использует аббревиатуру C_q вместо C_t .

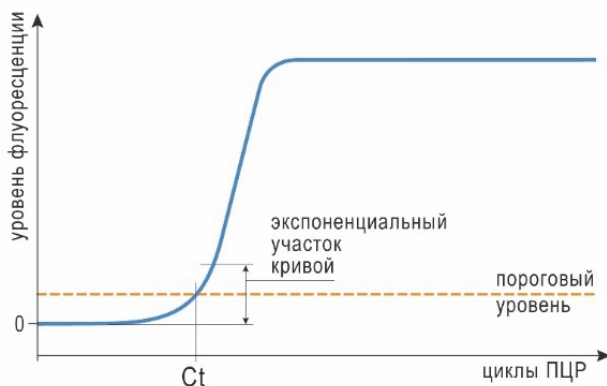


Рисунок 3 – схема нахождения экспоненциального участка кривой накопления продукта, порогового уровня и порогового цикла.

19.2 Контроль качества результатов измерения

Контроль качества результатов измерительной ПЦР обеспечивается:

- проведением контрольной реакции НТС (без матрицы ДНК). Способ контроля – определение статуса ДНК-контаминации компонентов набора «КвантумДНК» по результатам реакции НТС.

В норме, при отсутствии контаминации, значение C_t (НТС) по каналу FAM превышает 40 или не определяется, при этом значение C_t внутреннего контроля по каналу HEX меньше 38.

Если по каналу FAM значение C_t менее 40, то результаты измерения использовать нельзя.

Указанная проверка предупреждает искажение результатов измерения, а именно завышение значения эффективной концентрации ДНК.

Контроль качества результатов измерительной ПЦР также обеспечивается:

- контролем эффективности ПЦР по каналу FAM для калибровочных образцов «Стандарт 1», «Стандарт 2», «Стандарт 3».

В норме, эффективность прохождения ПЦР для каждой мишени (91, 156 или 211 п.о.) должна быть более 80%, а значение R^2 должно быть не ниже 0.98 (значения рассчитывает ПО амплификатора).

Если эффективность ПЦР ниже 80% или значение R^2 ниже 0.98, то результаты измерения использовать нельзя.

Указанная проверка предупреждает искажение результатов измерения, а именно увеличение случайной ошибки при определении эффективной концентрации ДНК.

Если хотя бы один из показателей измерительной ПЦР не соответствует норме, необходима перестановка ПЦР (см. раздел «Меры при ненадлежащем качестве результатов измерения»).

Контроль качества результатов определения наличия ингибиторов обеспечивается:

- контролем разброса значений C_t по каналу HEX для калибровочных образцов «Стандарт 1», «Стандарт 2», «Стандарт 3».

В норме разница между максимальным и минимальным значением C_t по каналу HEX не должна превышать 4 цикла (с учетом всех технических повторностей для всех Стандартов ДНК). При этом максимальное значение C_t должно быть менее 38.

Если разброс значения C_t превышает 4 цикла, то определить наличие ингибиторов ПЦР нельзя.

Указанная проверка корректности реакции ВК для образцов, не содержащих ингибиторы, обеспечивает возможность качественного определения наличия ингибиторов ПЦР, исключив риск ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

19.3 Анализ данных определения эффективной концентрации ДНК

Эффективная концентрация ДНК исследуемого образца рассчитывается ПО амплификатора автоматически.

Необходимо учесть разведение образца ДНК, если для измерения использовалась разбавленная аликвота образца.

При эффективной концентрации образца выше 300 нг/мкл разбавить аликвоту образца ДНК буфером ТЕ или водой в 50 раз и повторить измерение.

В случае, если значение эффективной концентрации ДНК менее 0.1 нг/мкл, точно определить данное значение невозможно. Рекомендуется перевыделить образец для получения препарата с более высокой концентрацией ДНК.

19.4 Анализ данных определения наличия ингибиторов ПЦР

При наличии в образце ингибиторов ПЦР среднее значение C_t внутреннего контроля исследуемого образца превышает максимальное значение C_t внутреннего контроля Стандартов ДНК на 3 цикла или не определяется (см. рис. 4).

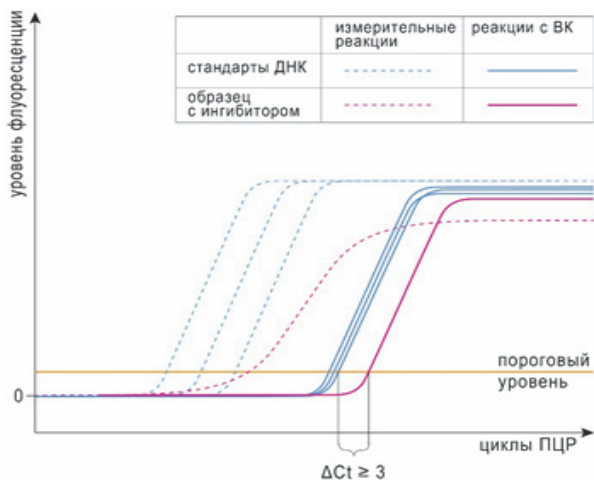


Рисунок 4 – схема сравнения значений C_t внутреннего контроля исследуемого образца и Стандартов ДНК в канале HEX.

При наличии ингибиторов ПЦР рекомендуется очистка образцов или повторное выделение ДНК.

Если значение C_t внутреннего контроля исследуемого образца превышает максимальное значение C_t внутреннего контроля Стандартов ДНК на 3 цикла или не определяется, а эффективная концентрация ДНК образца более 300 нг/мкл, наличие ингибиторов определить нельзя. Рекомендуется разбавить аликвоту образца ДНК буфером ТЕ или водой в 50 раз и повторить измерение.

19.5 Меры при ненадлежащем качестве результатов измерения

ВНИМАНИЕ!

ПРИ НАДАДЛЕЖАЩЕМ КАЧЕСТВЕ РЕЗУЛЬТАТОВ – ВЫПОЛНИТЬ ИЗМЕРЕНИЕ ПОВТОРНО, ПРИНЯВ НАДЛЕЖАЩИЕ МЕРЫ ПО УСТРАНЕНИЮ ВОЗМОЖНЫХ ПРЕПЯТСТВИЙ.

Меры, применяемые при контаминации реакционной смеси посторонней ДНК:

1. Сменить раствор, используемый для разведения ДНК, и воду, используемую для замешивания общей реакционной смеси.
2. Провести дополнительные меры по деконтаминации рабочих зон (сменить комплект автоматических дозаторов, рабочее место; обработать дозаторы и рабочие поверхности деконтаминирующим раствором).
3. Если перечисленные меры не помогают, заменить набор реагентов.

Меры, применяемые при не прохождении реакции со Стандартами ДНК (отсутствует сигнал в двух повторностях одного и более Стандартов ДНК):

1. Убедиться в правильности выполнения протокола.
2. Проверить срок годности набора реагентов.
3. Проверить условия хранения.
4. Если перечисленные меры при повторной постановке ПЦР не помогают, заменить набор реагентов.

Меры, применяемые при эффективности прохождения измерительной реакции ниже 80% или значение R^2 ниже 0.98, при разбросе значений C_t в канале HEX для Стандартов ДНК более 4 циклов:

1. Убедиться, что все мишени (Targets) обозначены корректно (91, 156 или 211).
2. Убедиться, что режим анализа – «Мишень» (Target).
3. В канале FAM выставить базовую линию для каждой пары Стандартов ДНК: с 10 цикла* по цикл, после которого начинается развитие сигнала для данного Стандарта.

Ожидаемые значения:

- Стандарт 1: 26-27 цикл;
- Стандарт 2: 23-24 цикл;
- Стандарт 3: 20-21 цикл.

В канале HEX выставить базовую линию для всех образцов с 10 по 30 цикл.

4. Проверить точность калибровки ПЦР-амплификатора и автоматических дозаторов.
5. Переставить ПЦР, исключив ошибку выполнения протокола. Перед новой постановкой эксперимента все реактивы после размораживания тщательно перемешать 3-4х кратным переворачиванием, а затем импульсным встряхиванием на микроцентрифуге. Общую реакционную смесь следует перемешивать пипетированием (тремя четвертями от общего объема смеси).
6. Если перечисленные меры не помогают, заменить набор реагентов.

20. Утилизация (уничтожение) и дезинфекция

При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утвержденных департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г.). Нормы контроля, дезинфекции и утилизации изложены в Постановлении Главного государственного санитарного врача РФ от 9 декабря 2010 г. № 163 «Об утверждении СанПиН 2.1.7.2790-10 „Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами“».






Дезинфекцию, а также утилизацию или уничтожение наборов реагентов и отходов следует проводить в соответствие с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Возможные типы отходов:

- все компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности набора реагентов, и упаковочная тара (класс А);
- использованные в ходе работы набора реагентов компоненты (класс Б);

Компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности, имеют класс опасности А на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Графические символы

 The symbol consists of the letters 'REF' in a bold, sans-serif font, enclosed within a rectangular border.	Номер по каталогу
 A stylized icon of a factory with a sawtooth roof and a tall chimney on the right side.	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
 An icon of an hourglass with a black shaded bottom bulb.	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
 An icon of a thermometer with a vertical scale and a bulb at the bottom.	Температурный диапазон
 A red equilateral triangle with a thick black border and a large black 'X' in the center.	Осторожно. Вредные для здоровья аллергические (раздражающие) вещества

Техническая поддержка: md-support@nomotech.ru

Изготовитель: ООО «НОМОТЕК»

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10

Тел.: +7 (495) 988-4083

www.nomotech.ru