



Набір діагностичний «Fluorospec «CMV-FR»

для виявлення ДНК цитомегаловірусу методом полімеразної ланцюгової реакції з гібридаційно-флуоресцентною детекцією продуктів у реальному часі

Склад набору



Короткий опис



Найменування	Контейнер	Умови зберігання	Місце зберігання
ПЛР буфер	1 пробірка 1,5 мл	-20 °С...+4 °С	Чиста зона (вільна від ДНК)
Праймери/зонди CMV-FR	1 пробірка 0,5 мл	-20 °С	
Taq polymerase	1 пробірка 0,5 мл	-20 °С	Зона підготовки проб (виділення ДНК)
Позитивний контрольний зразок (К+)	1 пробірка 0,5 мл	-20 °С	
Негативний контрольний зразок (К-)	1 пробірка 0,5 мл	-20 °С...+4 °С	

Діагностичний набір «Fluorospec «CMV-FR» призначений для виявлення цитомегаловірусу людини (CMV) методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). Дозволяє встановити наявність та титр вірусу. Набір нечутливий до присутності інших вірусів, у тому числі герпесвірусів.

Реагенти набору ампліфікують специфічну ділянку вірусного геному а також ДНК людини (для контролю якості зразка). Ампліфікація візуалізується за флуоресценцією ПЛР-зондів: FAM для ДНК CMV і ROX для ДНК людини.

Заходи безпеки



Необхідне обладнання



Необхідні матеріали

Діагностичний набір не містить токсичних компонентів, не містить життєздатного цитомегаловірусу. Дотримуйтесь звичайної техніки безпеки при роботі в лабораторії. При потраплянні компонентів набору в очі чи на слизові оболонки – промийте великою кількістю води.

- ✿ Ламінар-бокс для ПЛР
- ✿ Піпетки механічні (дозатори) на 5, 10 і 100 мкл або змінного об'єму
- ✿ Мікроцентрифуга для ПЛР-пробірок (або для стрипів чи планшетів)
- ✿ Ампліфікатор (термоциклер) з можливістю детекції флуоресценції по каналах FAM та ROX

- ✿ Пробірки для ПЛР в реальному часі (з прозорими кришками) об'ємом 0,2 мл
- ✿ Одноразові наконечники для механічних піпеток (дозаторів)

Спосіб застосування. Постановка аналізу



Дослідження проводиться на зразках ДНК, виділених з крові пацієнтів. Допускається використання будь-яких комерційних наборів для виділення ДНК (виділення на колонках, виділення на сорбенті, висолування/протей-наза К, фенол-хлороформна екстракція тощо).

Чистота виділеної ДНК має вирішальне значення для чутливості аналізу!

Постановка аналізу має включати:

- 1 Зразки досліджуваної ДНК
- 2 Позитивний (К+) контроль
- 3 Негативний (К-) контроль



К+ і К- бажано проводити через процедуру виділення ДНК, поряд з досліджуваними зразками. Якщо цього не було зроблено, то додавати їх до постановки бодай на етапі ампліфікації.

Постановка реакції. Реакційна суміш



Компонент	Додати на 1 реакцію	Змішується в
ПЛР буфер	10 мкл	Чиста зона
Taq polymerase	0,5 мкл	
Праймери/зонди	5 мкл	Зона підготовки проб
Зразок ДНК	10 мкл	
Загальний об'єм	25 мкл	

Порядок роботи



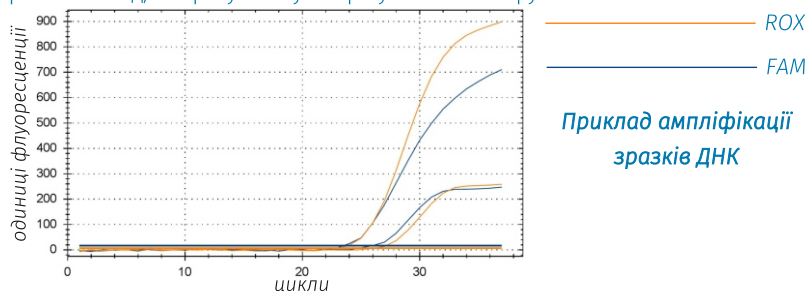
- 1 Розрахувати маточну реакційну суміш (master mix) на визначену кількість реакцій (враховуючи K- і K+).
Не забувати додавати одну додаткову реакцію для компенсації помилок рознесення!
У чистій зоні:
- 2 Додати Taq polymerase в ПЛР буфер.
Цю суміш можна зберігати 1 тиждень при температурі +4 °С.
- 3 Додати праймери/зонди.
У зоні підготовки проб:
- 4 Рознести реакційну суміш з внутрішнім контролем по ПЛР пробірках.
- 5 Додати зразки, K- і K+ у ПЛР пробірки.

Програма ампліфікації

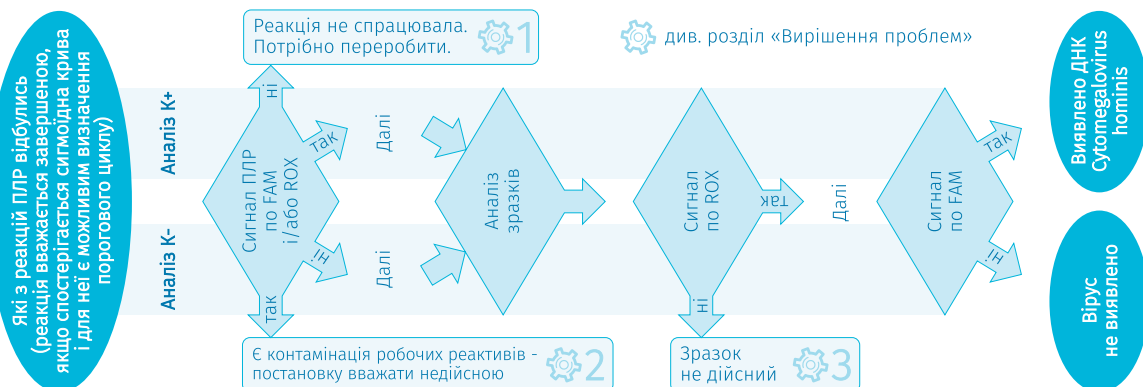


- 1: 95,0°C 15:00
 - 2: 95,0°C 0:10
 - 3: 60,0°C 0:20
 - 4: 72,0°C 0:20
- Перейти на 2, ще 4 рази
- 5: 95,0°C 0:10
 - 6: 60,0°C 0:20
- Зчитування флуоресценції
- 7: 72,0°C 0:20
- Перейти на 5, ще 44 рази

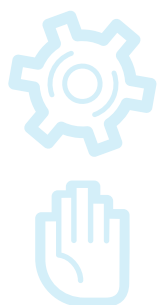
Температура напалення праймерів (стадії 3 і 6) може варіювати на 2-3 °С. Зчитування флуоресценції можна проводити і з першого циклу, але тоді криві можуть мати нерівний вигляд, і потребуватимуть корегування власноруч.



Аналіз результатів



Вирішення проблем



- 1 У K- є сигнали ПЛР по FAM і/або ROX: присутня контамінація. Визначте джерело контамінації і усуньте її. Можливі джерела: забруднені робочі поверхні; робочий одяг чи рукавички (халат, взуття) не змінювалися при переході між чистою зоною і зоною пробопідготовки; дозатори (проавтоклавуйте); повторне використання одноразових витратних матеріалів (наконечники для дозаторів, пробірки); забруднені реактиви — визначте забруднений реактив почергово комбінуючи компоненти суміші, що наразі використовуються, зі свіжими. Замініть забруднені реактиви на свіжі. Для запобігання контамінації реактивів використовуйте робочі аликвоти: наприклад, якщо за день ви зазвичай опрацюєте 10 зразків, то розділіть реактиви на відповідні порції і зберігайте окремо, використовуйте порції по черзі.
 - 2 У K+ і/або зразках немає сигналу ПЛР. Переробіть постановку. Переконайтеся, що до реакційної суміші додані всі компоненти, в тому числі полімераза до ПЛР буферу. Переконайтеся, що у реактивів не вийшов термін придатності і були дотримані належні умови зберігання.
 - 3 У зразках відсутній сигнал ROX. Це може означати відсутність людської ДНК в зразку. Можливі причини: неякісний забір зразка, неякісне виділення ДНК. Повторіть виділення ДНК зі зразка і/або забір зразка у пацієнта.
- На перших циклах спостерігаються сплески флуоресценції, криві мають «просаджений» вигляд.* Це не є проблемою і часто спостерігається при низькій концентрації ДНК в зразку. Виставте на термоциклері аналіз даних починаючи тільки з 5 циклу.
- Криві ампліфікації мають дуже пологий вигляд:* низька ефективність ампліфікації, причиною може бути забруднений зразок ДНК. Повторіть виділення ДНК зі зразка.



ТОВ «Укрмедспілка»
ukrmedspilka.com.ua
Україна, місто Київ,
вул. Сирецька, 37-А



ЕЛЕКТРОННА ПОШТА
ukrmedspilka@ukr.net
РОЗКЛАД РОБОТИ
Пн-Пт, з 9:00 до 17:00

Н а б і р
діагностичний
«Fluorospec
«СМВ-FR»

ТЕЛЕФОНИ / ФАКСИ

факс +38 (044) 529-23-40
тел. +38 (044) 353-37-79
тел. +38 (050) 462-24-37
тел. +38 (066) 138-83-08
тел. +38 (096) 108-74-63