

Амплификатор	Параметр	Канал флуоресценции		
		FAM	HEX	
IQ5 (Bio Rad)	Baseline Cycles	Auto	Auto	
	Baseline threshold	100	80	
	Конечный цикл	КОМИТАНС	35	35
		ГИНГИПОЛ		
		ДОНТАПОЛ		
		ДЕНТИКОЛА		
		ТАНЕРЕЛЛА		
ПРЕВОТЕЛЛА-intermedia				
НУКЛЕОПОЛ				
ДТ96 (ДНК-Технология)	Baseline threshold	100	10	
	Конечный цикл	КОМИТАНС	35	35
		ГИНГИПОЛ		
		ДОНТАПОЛ		
		ДЕНТИКОЛА		
		ТАНЕРЕЛЛА		
	ПРЕВОТЕЛЛА-intermedia			
НУКЛЕОПОЛ				
RotorGene Q RotorGene 6000 (Qiagen)	Dynamic Tube	ON	ON	
	Slope correct	ON	ON	
	Ignore first	5	5	
	Baseline threshold	0.03	0.03	
	Outer removal	10%	15%	
	Eliminate cycles before	10	10	
	Reaction Efficiency Threshold	OFF	OFF	
	Конечный цикл	КОМИТАНС	35	35
		ГИНГИПОЛ		
		ДОНТАПОЛ		
ДЕНТИКОЛА				
ТАНЕРЕЛЛА				
ПРЕВОТЕЛЛА-intermedia				
НУКЛЕОПОЛ				

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct), построит калибровочные кривые и рассчитает содержание ДНК каждого возбудителя в исследуемых образцах. Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления с пороговой линией не произошло (НЗ). КЦ означает Конечный цикл.

Образец	Значения Ct Содержание ДНК		Результат
	Канал FAM	Канал HEX	
S11 и S12	Ct < КЦ	Любое значение Ct	Реакция прошла.
	Ct - НЗ или > КЦ	Любое значение Ct	Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа.
ОКО	<10 ⁴ (10 ³ для КОМИТАНС)	Ct - НЗ или > КЦ	Специфическая контаминация отсутствует.
	≥ 10 ⁴ (10 ³ для КОМИТАНС)	Любое значение Ct	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа.
	<10 ⁴ (10 ³ для КОМИТАНС)	Ct < КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа.
Исследуемый образец	≥ 10 ⁴ (10 ³ для КОМИТАНС)	Любое значение Ct	ПРИСУТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	<10 ⁴ (10 ³ для КОМИТАНС)	Ct < КЦ	ОТСУТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	<10 ⁴ (10 ³ для КОМИТАНС)	Ct - НЗ или > КЦ**	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»:
многоканальный телефон (495) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru

ПАМЯТКА

по применению набора реагентов для выявления ДНК возбудителей заболеваний пародонта методом полимеразной цепной реакции
КОМПЛЕКС ДЕНТОСКРИН

Комплектация TwoStep-PB-96

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ДЕНТОСКРИН** предназначен для выявления и количественной оценки ДНК возбудителей заболеваний пародонта методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени в биологическом материале. В состав набора реагентов входят следующие реакционные смеси:

Реакционная смесь	Канал флуоресценции/детектируемый возбудитель	
	FAM/Green	HEX/Yellow
КОМИТАНС	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	
ГИНГИПОЛ	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
ДОНТАПОЛ	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	
ДЕНТИКОЛА	<i>Treponema denticola</i>	
ТАНЕРЕЛЛА	<i>Tannerella forsythia</i>	
ПРЕВОТЕЛЛА-intermedia	<i>Prevotella intermedia</i>	
НУКЛЕОПОЛ	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
	Внутренний контроль	

Отдельно вложены пробирка с разбавителем, который используется в качестве единого отрицательного контроля для всех возбудителей, и 14 подписанных пробирок с лиофилизированными стандартными образцами под каждый возбудитель в отдельном пакете. Под каждый возбудитель рассчитаны два стандартных образца с концентрацией в пределах 10³-10⁷ геном-эквивалентов/мл.

Точное значение концентрации для каждого стандарта указано на этикетке пробирки (может различаться для разных серий)!

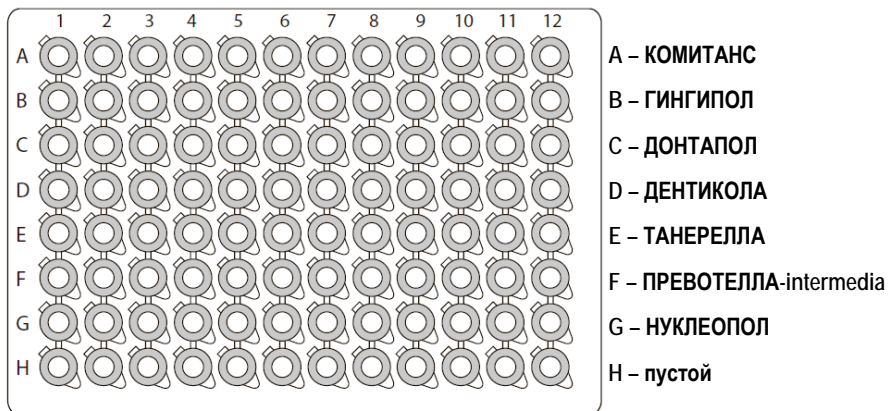
Лиофилизированные стандарты перед применением следует развести в **55 мкл** раствора для восстановления, тщательно перемешать на вортексе, плотно закрыть крышки и оставить на 10-15 минут при комнатной температуре, отцентрифугировать в течение 3-5 секунд для сброса капель с крышки. **Растворенные стандарты следует хранить при температуре -20°C.**

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет 10000 и более геном-эквивалентов/мл *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* и 1000 и более геном-эквивалентов/мл *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе.

Для внутреннего контроля в качестве мишени используется участок генома человека. При анализе образцов не содержащих ДНК человека или содержащих ее в следовых количествах необходимо использовать экзогенный внутренний контроль (ЭВК).

1. Подготовка к проведению амплификации.

1.1. Достать из коробки необходимое количество пробирок с реакционной смесью, включая пробирки для двух стандартов и отрицательного контрольного образца. Если реакция проводится на анализаторе RotorGene, то на крышки пробирок может быть нанесена маркировка, в противном случае маркировка пробирок не допустима! На один образец готовится семь пробирок (один стрип). Расположение реакционных смесей представлено на схеме:



1.2. Пробирку с раствором Taq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

1.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл раствора Taq-полимеразы. Перейти к п.2.

2. Проведение амплификации.

2.1. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- а) в пробирку отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;
- б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в пробирки стандартных образцов – St1 и St2 из комплекта набора (для каждой реакционной смеси используются свои St1 и St2).

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

2.2. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (каналы FAM и HEX):

CFX 96 (BioRad) RotorGene Q (Qiagen)* RotorGene 6000 (Corbett Research)*		
+80 °C	2 мин	1 цикл
+95 °C	1 мин 30 сек	1 цикл
+95 °C	15 сек	40 циклов
+60 °C	30 сек (считывание)	
+72 °C	40 сек	

*. ВНИМАНИЕ! калибровка по всем используемым каналам по 1-й пробирке! В первую позицию ротора установите пробирку с реакционной смесью КОМИТАНС!

ДТ-96 (ДНК-Технология)		
+80 °C	2 мин	1 цикл
+94 °C	1 мин 30 сек	1 цикл
+94 °C	10 сек	40 циклов
+64 °C	23 сек (считывание)	
+72 °C	20 сек	

iCycler IQ5 (BioRad)

+80 °C	2 мин	1 цикл
+94 °C	1 мин 30 сек	1 цикл
+94 °C	10 сек	40 циклов
+62 °C	30 сек (считывание)	
+72 °C	20 сек	

Для автоматического расчета концентрации ДНК для каждого возбудителя программным обеспечением прибора необходимо назначить стандартным образцам тип «Стандарт» и задать их концентрацию в геном-эквивалент/мл (указана на этикетке стандартного образца). Программное обеспечение представленных амплификаторов позволяет изменять тип образца после прохождения программы амплификации. Обсчет полученных результатов должен производиться для каждой реакционной смеси индивидуально по ее стандартным образцам.

3. Анализ и интерпретация результата.

После завершения программы амплификации применить следующие настройки:

Амплификатор	Параметр	Канал флуоресценции		
		FAM	HEX	
CFX96 (Bio Rad)	Analyze Data from Cycle 5 to 40 Baseline Setting – Apply Fluorescence Drift Correction			
	Baseline threshold	60	30	
	Конечный цикл	КОМИТАНС	35	35
		ГИНГИПОЛ		
		ДОНТАПОЛ		
		ДЕНТИКОЛА		
		ТАНЕРЕЛЛА		
ПРЕВОТЕЛЛА-intermedia				
НУКЛЕОПОЛ				