

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
В.И.Покровский  
«15» февраля 2012 г.

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор Федерального  
казенного учреждения  
здравоохранения Российского  
научно-исследовательского  
противочумного института  
«Микроб» Федеральной  
службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
В.В. Кутырев  
«15» февраля 2012 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и  
идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в  
биологическом материале и объектах окружающей среды  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
гибридизационно-флуоресцентной детекцией  
**«АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL»**

**АмплиСенс®**



Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Центральный научно-исследовательский  
институт эпидемиологии»,  
Российская Федерация, 111123,  
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК .....	11
ФОРМАТ FRT .....	13
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ОБРАЗЦОВ .....	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	15
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	15
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» .....	16
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» .....	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК ИЗ ПРОБ. При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп».....	25
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	27

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВК+	- положительный контроль амплификации образца ВКО
ВКО	- внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» предназначен для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (по наличию последовательности *hly*), идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* (по наличию основных факторов вирулентности – *ctxA*, *tcrA*) и для определения принадлежности к серогруппам O1 (по наличию амплификации мишени *wbeT*) и O139 (по наличию амплификации мишени *wbfR*) в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

**ВНИМАНИЕ!** Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания<sup>1</sup>.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Vibrio cholerae* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала и объектов окружающей среды, амплификацию участка ДНК *Vibrio cholerae* и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО *Vibrio cholerae*), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводится реакция амплификации

<sup>1</sup> В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

участков ДНК *Vibrio cholerae* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемых ДНК-мишеней, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Постановка реакций осуществляется в формате «мультиплекс» в двух пробирках, с использованием «горячего старта»: «Скрин» – амплификация мишеней *ctxA* (FAM), *tcrA* (ROX) и ВКО (JOE), «Тип» – амплификация мишеней *hly* (JOE) – холерные вибрионы всех серогрупп, *wbeT* (FAM) – принадлежность к серогруппе O1, *wbfR* (ROX) – принадлежность к серогруппе O139. Для интерпретации результатов необходима постановка обеих реакций «Скрин» и «Тип».

## **ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

**Набор реагентов выпускается в 1 формате.**

### **Формат FRT**

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 2** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 3** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала или объектов окружающей среды и амплификацию ДНК *Vibrio cholerae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК *Vibrio cholerae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо

использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Аналитическая чувствительность
Фекалии нативные	«ДНК-сорб-В» – для всех типов материала, «РИБО-преп» - для фекалий водянистой консистенции	1×10 <sup>3</sup> ГЭ/мл <sup>2</sup> 1×10 <sup>3</sup> м.к./мл <sup>3</sup>
Мазки со слизистой прямой кишки		
Рвотные массы		
Секционный материал		
Вода после предварительной фильтрации		
Смывы с объектов окружающей среды		
Пептонная вода после посева биологического материала или пищевых продуктов		
Культуры микроорганизмов		

**Примечание** – Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил подготовки исследуемого материала при следовании данной инструкции.

### Аналитическая специфичность

Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании штаммов *V.cholerae*: Р-1, КМ-569, 10588, КМ 26, М045, 17 полевых изолятов *V.cholerae* О1 серогруппы, выделенных в 1991, 1994 и 1999 годах, 15 полевых изолятов *V.cholerae* других серогрупп, выделенных в 2000, 2001 и 2002 годах (из коллекции Противочумной станции Украины), 42 изолята, выделенных от людей и из объектов окружающей среды за 1965-2004 гг из Государственной коллекции патогенных бактерий ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

<sup>2</sup> Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

<sup>3</sup> Чувствительность выражается в микробных клетках (м.к.) возбудителя в 1 мл пробы.

Отсутствие перекрестной реакции при определении принадлежности к серогруппе O1 и O139 доказано при тестировании штаммов *V.cholerae*, относящихся к различным серогруппам: O2-O9, O11-O14, O16-O33, O35, O36, O39-O63, O65-O69, O71, O73-O75, O77, O79-O82 из Государственной коллекции патогенных бактерий (РосНИПЧИ «Микроб»).

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК близкородственных микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры и ряда других возбудителей кишечных инфекций: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio proteolyticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Morganella morganii*, *Enterobacter faecalis*, *Aeromonas*, *Plesiomonas shideli*, *Comamonas*, а также кДНК/ДНК человека.

При исследовании 100 образцов фекалий людей без энтеритов и 50 образцов фекалий людей с энтеритами различной бактериальной и вирусной этиологии ложноположительных результатов не выявлено.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Работа с исследуемым материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами I–II групп патогенности, должна проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», утвержденными Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г. Онищенко 12 марта 2003 г., СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как

инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

**ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР), недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

1. Мертиолят натрия, 0,1 % раствор. Для приготовления 0,1 % раствора мертиолята натрия 0,1 г мертиолята растворяют в 100 мл стерильного 0,9 % раствора хлорида натрия. Полученный 0,1 % раствор мертиолята хранят во флаконе из темного стекла не более 3 месяцев при температуре от 2

- до 8 °С.
2. Комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2008) или комплект реагентов для выделения ДНК/РНК «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) при работе с формой комплектации 2.
  3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
  4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
  5. Центрифуга/вортекс.
  6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
  7. Одноразовые наконечники с фильтром на 100 и 200 мкл в штативах.
  8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
  9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
  10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
  11. Емкость для сброса наконечников.
  12. Одноразовые полипропиленовые тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США).
  13. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

## **ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Отбор материала для исследования производится в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 31 мая 2007 г. Введены 1 августа 2007 г.

## **ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ**

**Образцы клинического материала:**



- фекалии нативные 1,0–2,0 г (или 1-2 мл при наличии диареи) или помещённые в пробирку с 5 мл 1 % пептонной воды используются после предварительной подготовки;
- рвотные массы (1-2 мл) нативные или помещённые в 5 мл 1 % пептонной воды используются после предварительной подготовки;
- мазок содержимого прямой кишки с глубины 5-6 см, взятый ректальным ватным тампоном (ректальной металлической петлей), помещается в пробирку объёмом 1,5 мл с 0,5 мл 1 % пептонной воды, тщательно взбалтывается, ватный тампон отжимается о стенки пробирки и удаляется в емкость с дезраствором. Для исследования используется 50 мкл раствора.

#### **Образцы секционного материала:**

- содержимое верхней, средней и нижней частей тонкой кишки по 0,5 мл помещают в пустые бактериологические пробирки (исследуют как нативный материал фекалий) и в пробирки с 5 мл 1 % пептонной воды (исследуют как подрощенный материал).

#### **Образцы из окружающей среды (с целью мониторинга):**

- вода (сточная, из водоема, питьевая, объемом 1 л) отбирается и подвергается обработке по МУК 4.2.2218-07. Для исследования используется первая пептонная вода (после предварительной подготовки);
- ил, гидробионты отбираются и подвергаются обработке по МУК 4.2.2218-07. Для исследования используется первая пептонная вода (после предварительной подготовки).

#### **Образцы из окружающей среды в очаге:**

- вода (сточная, из водоема, питьевая) отбирается по МУК 4.2.2218-07, подвергается предварительному фильтрованию через фильтры с диаметром пор 8 мкм (или бумажные фильтры) и окончательному фильтрованию с использованием фильтров с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтры измельчают и помещают в стерильные пробирки объемом 10-15 мл с 5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, встряхивают в течение 10 минут с помощью шейкера. Для исследования методом ПЦР отбирают 1,0 мл в пробирки с завинчивающейся крышкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12 тыс об/мин в течение 10 мин.

Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия.

В случае получения отрицательного результата анализа необходимо провести посев смывов с фильтров по МУК 4.2.2218-07 и тестирование первой пептонной воды (после предварительной обработки);

- смывы с поверхностей предметов (площадью 10 x 10 см), взятые стерильным зондом, смоченным физиологическим раствором (рабочая часть зонда с тампоном помещается в пробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл 1 % пептонной воды, остальная часть зонда отламывается и удаляется). Для исследования используется 50 мкл раствора без предварительной подготовки.

**Пищевые продукты** отбираются и подвергаются обработке по МУК 4.2.2218-07. Для исследования используется первая пептонная вода (после предварительной подготовки).

**Культуры микроорганизмов**, подозрительные на *Vibrio cholerae*:

- колонию ресуспендировать в 0,5 мл физиологического раствора или фосфатно-буферной смеси. Для исследования использовать 50 мкл суспензии.

Допускается хранение и транспортирование в лабораторию для проведения исследования вышеперечисленного материала: в течение 2 ч при температуре окружающей среды, в течение 1 сут – при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 16 °С. Допускается однократное замораживание – оттаивание материала.

Все работы по транспортированию проб исследуемого материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

## ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

### Нативные фекалии:

А. Приготовление 10-20 % фекальной суспензии (фекалии водянистой консистенции используются без приготовления суспензии).

1. В пробирки на 5 мл с плотно закрывающейся (завинчивающейся) крышкой, внести по 4 мл физиологического раствора или фосфатно-буферной смеси.
2. В каждую пробирку отдельными наконечниками с фильтрами (или одноразовыми лопатками) внести по 0,5–1,0 г (около 0,5–1,0 мл) фекалий и тщательно перемешать содержимое до образования гомогенной суспензии. При необходимости хранения к суспензии добавляют глицерин до концентрации 20 %, перемешивают и хранят при температуре **не выше минус 16 °С**.

Б.1. Приготовление бактериальной фракции фекалий (для фекалий плотной консистенции):

Из пробирок с фекальной суспензией перенести 1 мл суспензии в пробирки на 1,5 мл с плотно закрывающейся крышкой и центрифугировать на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс об/мин. Для экстракции ДНК использовать 50 мкл светлой фракции, находящейся на границе жидкой прозрачной и твердой фракций фекалий.

Б.2. Приготовление бактериального осадка фекалий (для фекалий водянистой консистенции):

Из пробирок с фекальной суспензией перенести 1 мл суспензии в пробирки на 1,5 мл с плотно закрывающейся крышкой и центрифугировать на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс об/мин. Удалить часть надосадочной жидкости, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы, оставить 100-150 мкл жидкости над осадком. Тщательно ресуспендировать осадок в оставшемся объеме и далее использовать полученную суспензию для экстракции ДНК.

### Фекалии или рвотные массы, помещённые в 1 % пептонную воду:

А. Тщательно перемешать содержимое пробирок до

образования гомогенной суспензии.

Б. Приготовление бактериальной фракции:

1 мл суспензии перенести в пробирки на 1,5 мл с плотно закрывающейся крышкой и центрифугировать на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс об/мин. Для экстракции ДНК использовать 50 мкл светлой фракции, находящейся на границе жидкой прозрачной и твердой тёмной фракций.

**Образцы секционного материала** (содержимое тонкой кишки):

Тщательно перемешать содержимое пробирок до образования гомогенной суспензии. Для экстракции ДНК использовать 50 мкл суспензии.

**Первичная или вторичная среда накопления (после подращивания):**

С поверхности пептонной воды отобрать 1,0 мл в пробирку объёмом 1,5 мл и центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс об/мин. Удалить надосадочную жидкость с помощью пипетки, используя наконечники с фильтром. Осадок ресуспендируют в 300 мкл физиологического раствора или фосфатно-буферной смеси. Для исследования используют 50 мкл раствора.

## ФОРМАТ FRT

### ФОРМАТ FRT СОСТАВ

**Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50** – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>4</sup>	15	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT** – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> скрин раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> тип раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Vibrio cholerae</i> скрин	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Vibrio cholerae</i> тип	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ВК	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

<sup>4</sup> При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>ОКО</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	2 пробирки
<b>ВКО <i>Vibrio cholerae</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования изложена в методических рекомендациях к инструкции «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL».

## **ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ОБРАЗЦОВ**

Проводится в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». К подготовленным образцам добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01 %) с последующим прогреванием их при  $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Далее необходимое количество материала добавляют в лизирующий раствор, входящий в комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (порядок работы см. в приложении 1) или в раствор для лизиса, входящий в комплект реагентов «РИБО-преп» (порядок работы см. в приложении 2). Материал считается обеззараженным после выполнения этапа инкубации при температуре  $65^\circ\text{C}$  в течение 15 минут.

## **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО *Vibrio cholerae* (ВКО).

В работе с формой комплектации набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (порядок работы см. в приложении 1).

Для фекалий водянистой консистенции после их предварительной подготовки рекомендуется использовать комплект реагентов «РИБО-преп» (порядок работы см. в приложении 2).

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

### **А. Подготовка пробирок для амплификации**

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

**Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.**

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин и ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Пробирки промаркировать – «С» и «Т».
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FRT.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь (в случае использования сорбентной методики экстракции ДНК).**
4. Поставить контрольные реакции:
  - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
  - б) **положительный контроль (К+<sub>скрин</sub>)** – в подготовленную для ПЦР пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин внести **10 мкл ПКО ДНК *Vibrio cholerae* скрин**.
  - в) **положительный контроль (К+<sub>тип</sub>)** – в подготовленную для ПЦР пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип внести **10 мкл ПКО ДНК *Vibrio cholerae* тип**.
  - г) **положительный контроль (ВК+)** – в подготовленную для ПЦР пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин внести **10 мкл ПКО ВК**.

**Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»**

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 1).

Таблица 1

Цикл	Приборы роторного типа <sup>5</sup>		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин	1
2	95	10 с	10
	60	25 с	
	72	10 с	
3	95	10 с	35
	56	25 с	
		детекция флуоресц. сигнала	
72	10 с		

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. **Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.**

**ВНИМАНИЕ!** Если проводится одновременная постановка «Скрин» и «Тип», калибровку необходимо проводить по пробирке «К-» с **ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин**, то есть поместить её в 1-ю позицию ротора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

**АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Более подробный порядок проведения обработки и интерпретации полученных результатов описан в методических рекомендациях по применению набора реагентов «**АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL**».

<sup>5</sup> Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия); Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).



**ВНИМАНИЕ!** Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить индивидуально, выделив область пробирок, относящихся к данной ПЦР-смеси-1.

Анализ результатов амплификации с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин:

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- По каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *ctxA*;
- По каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО *Vibrio cholerae* (ВКО);
- По каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *tcrA*.

Анализ результатов амплификации с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип:

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- По каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *wbeT* (принадлежность к серогруппе O1),
- По каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *hly* (холерные вибрионы всех серогрупп),
- По каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *wbfR* (принадлежность к серогруппе O139).

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<sub>t</sub>* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

1. **Образец считается положительным** по искомой мишени, если в таблице результатов пороговых циклов по соответствующему каналу для флуорофора, например, FAM («*Quant. Results – Cycling A. FAM/Green*»), для него определено значение *Ct*, не превышающее граничного значения.
2. **Образец считается отрицательным** по искомой мишени, если в таблице пороговых циклов по соответствующему каналу для него не указывается значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию – **Threshold**).
3. Образцы с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин для которых отсутствуют значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и ROX, а также отсутствует значение *Ct* (или получено значение *Ct* более граничного значения) по каналу для флуорофора JOE, требуют повторного проведения этапов экстракции ДНК и ПЦР.
4. Результаты тестирования образцов, для которых получен положительный результат по любой мишени, кроме hly (отрицательный результат по каналу для флуорофора JOE с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип) и получено значение *Ct* менее граничного по каналу для флуорофора JOE с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин, считать невалидными. Требуется повторные забор материала и исследование.
5. Результаты тестирования образцов с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип, для которых отсутствует значение *Ct* по каналу для флуорофора JOE, и выполняются условия пункта 3, считаются невалидными и требуют повторного проведения экстракции ДНК и ПЦР.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL».

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицами оценки результатов контрольных реакций (табл. 2, 3).**

Таблица 2

**Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла <i>Ct</i> по каналу для флуорофора		
		FAM (ctxA)	JOE (ВКО)	ROX (tcpA)
OK	Экстракция ДНК	Нет значений	< граничного значения	Нет значений
K-	ПЦР	Нет значений	Нет значений	Нет значений
K <sup>+</sup> <sub>скрин</sub>	ПЦР	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения
ВК+	ПЦР	Нет значений	< граничного значения	Нет значений

Таблица 3

**Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* тип**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла <i>Ct</i> по каналу для флуорофора		
		FAM (O1)	JOE ( <i>V.cholerae</i> )	ROX (O139)
OK	Экстракция ДНК	Нет значений	Нет значений	Нет значений
K-	ПЦР	Нет значений	Нет значений	Нет значений
K <sup>+</sup> <sub>тип</sub>	ПЦР	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 4, методическими рекомендациями по применению набора реагентов и вкладышем к набору реагентов «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL».

**Интерпретация результатов ПЦР-исследования**

	ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> скрин			ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> тип		
Варианты	Значение порогового Ct цикла по каналу					
	FAM (ctxA)	JOE (ВКО)	ROX (tcpA)	FAM (O1)	JOE ( <i>V.cholerae</i> )	ROX (O139)
<i>V.cholerae</i> O1 токсигенный	< граничного значения	Любое значение или отсутствие	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 токсигенный	< граничного значения	Любое значение или отсутствие	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения
<i>V.cholerae</i> O1 НЕ токсигенный, но содержащий последовательность <b>tcpA</b>	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 НЕ токсигенный, но содержащий последовательность <b>tcpA</b>	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения
<i>V.cholerae</i> O1 НЕ токсигенный	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 НЕ токсигенный	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	< граничного значения	< граничного значения
<i>V.cholerae</i> НЕ O1 и НЕ O139	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	< граничного значения	Нет значений
Холерные вибрионы НЕ обнаружены	Нет значений	< граничного значения	Нет значений	Нет значений	Нет значений	Нет значений

**ВНИМАНИЕ!**

1. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (на каналах для флуорофоров FAM и/или ROX – для ПЦР-смеси-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин и/или на любом из каналов – для ПЦР-смеси-1-FRT *Vibrio cholerae* тип) и для отрицательного контроля ПЦР (ДНК-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа положительных по данному каналу проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех

положительных по данному каналу проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

2. Отсутствие положительного сигнала в пробах с положительными контролями ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР повторно для всех отрицательных проб.

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

**Срок годности.** 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

**Хранение.** Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин и ПЦР-смесь-1-FRT *Vibrio cholerae* тип хранить в защищенном от света месте.

**Условия отпуска.** Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: [products@pcr.ru](mailto:products@pcr.ru))<sup>6</sup>.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации

Е.Д. Никонов



<sup>6</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).**

**Объем пробы, необходимый для экстракции ДНК – 0,05 мл.**

**Порядок работы.**

1. **Лизирующий раствор** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором** внести по **50 мкл ОКО** и **50 мкл проб** (после обработки мертиолятом натрия в соответствии с разделом «Обеззараживание образцов»), используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**.
4. Пробы тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть 15 мин при температуре 65 °С.
5. Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО *Vibrio cholerae***, перемешать и инкубировать 5 минут при температуре 65 °С.
6. Центрифугировать пробирку 5 мин на микроцентрифуге при 8-10 тыс g (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.
7. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 5 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
8. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 8-10 тыс g (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 30 с. Удалить

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

---

- надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировать 30 с при 8-10 тыс g (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  10. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировать 30 с при 8-10 тыс g (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  11. Повторить отмывку еще раз, следуя пункту **10**, удалить надосадочную жидкость полностью.
  12. Поместить пробирки в термостат с температурой 65 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
  13. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 65 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
  14. Центрифугировать пробирки при 8-10 тыс g (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.
- Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C и в течение года – при температуре не выше минус 16 °C.**



**ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК ИЗ ПРОБ. При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).**

**Объем пробы, необходимый для экстракции ДНК – 0,10 мл.**

**Порядок работы.**

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** внести по **100 мкл подготовленных проб** (после обработки мертиолятом натрия в соответствии с разделом «Обеззараживание образцов»), используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **15 мин при 65 °С** в термостате.
5. Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО *Vibrio cholerae***. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. При обнаружении в пробирках взвешенных частиц (не растворившегося полностью материала) следует провести центрифугирование при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в другие пробирки.
6. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая

## **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК**

---

- осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
  10. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
  11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.
  12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
  13. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
  14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.
  15. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
  16. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
  17. Центрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге.
  18. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.

**Очищенные ДНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.**

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации



Код партии



Максимальное число тестов



Изделие для in vitro диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель