

Система для детекции РНК вируса SARS-CoV-2 (2019-nCoV)

1. Описание

Система детекции вируса SARS-CoV-2 - это набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*, основанный на технологии одношаговой ОТ-ПЦР в реальном времени. Набор включает мультиплексную систему праймеров и зондов: систему, специфичную к последовательности гена N, и систему, детектирующую внутренний контроль. Технология ОТ-ПЦР в реальном времени использует реакцию обратной транскрипции (ОТ) для превращения РНК в комплементарную ДНК (кДНК) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации и детекции последовательностей-мишеней с помощью специфических праймеров и флуоресцентным зондов.

Набор предназначен для исследовательских работ. Не предназначен для проведения диагностики!

2. Компоненты набора:

Компонент	200 реакций
2× смесь для ОТ-ПЦР-РВ	2 × 1.25 мл
БиоМастер-микс	1 × 200 мкл
Набор праймеров N/ВК	1 × 620 мкл
Позитивный РНК-контроль N	1 × 200 мкл
Отрицательный контроль	1 × 200 мкл
Вода стерильная	1 × 1.25 мл

3. Инструментальная база:

Настоящая тест-система была разработана для использования на следующих амплификаторах с режимом детекции в реальном времени:

- LightCycler® 96 (Roche)
- LightCycler® 480 (Roche)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

4. Схема тестирования:

Образцы должны быть протестированы с использованием предоставленной системы праймеров и зондов с постановкой соответствующего положительного и отрицательного контролей. **Детекция сигнала амплификации:** для гена N должна проходить в канале FAM, для внутреннего контроля (ВК) – в канале VIC/TAMRA.

5. Проведение эксперимента

5.1 Подготовка образца:

Исходным материалом для исследований с использованием **Системы детекции вируса SARS-CoV-2** является РНК, выделенная из биологического образца.

Качество используемых образцов выделенной РНК оказывает критическое влияние на выявление вируса **SARS-CoV-2**. Необходимо убедиться, что система, используемая для экстракции нуклеиновых кислот, совместима с технологией ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Пригодность процедуры экстракции нуклеиновой кислоты для использования с **Системой детекции вируса SARS-CoV-2** должна быть проверена и подтверждена пользователем самостоятельно.

Мы рекомендуем для выделения вирусной РНК:

- Набор для выделения РНК из мазка/соскоба эпителиальных клеток на магнитных частицах (NAmagp100 и NAmagp200, ООО «Биолабмикс»)
- Набор для выделения РНК из мазка/соскоба эпителиальных клеток на колонках (RU-50 и RU-250, ООО «Биолабмикс»).

http://biolabmix.ru/products/covid-19_specialnie_predlozhenija_gotovie_resheniya/

5.2 Приготовление реакционной смеси:

Все реагенты и образцы следует полностью разморозить, перемешать (путем пипетирования или легкого встряхивания) и сбросить капли центрифугированием.

Рекомендуем приготовить премиксы реагентов с набором праймеров и зонда N/BK, исходя из следующей формулы: $(2+x+1)$ реакционных смесей, где 2 – реакции с положительным и отрицательным контролями, x – количество образцов и +1 дополнительный объем для компенсации возможной ошибки пипетирования.

Реактив	Кол-во на 1 реакцию	Кол-во на 7 образцов
2× смесь для ОТ-ПЦР-РВ	12,5	125
БиоМастер-микс	1,0	10
Набор праймеров N/BK	3,0	30
Вода стерильная	3,5	35
Суммарный объем	20,0	200

Всё перемешать на вортексе и сбросить капли центрифугированием.

5.3 Постановка реакции:

Возьмите 96-луночный планшет, добавьте, используя автоматическую пипетку, по **20** мкл подготовленного премикса в зависимости от стадии тестирования.

Добавить по 5,0 мкл раствора образца (раствор после выделения РНК) и контроли (положительного и отрицательного) в соответствующие ячейки, содержащие премиксы с системой праймеров и зондов.

Убедитесь, что положительные и отрицательные контроли были добавлены.

Аккуратно перемешайте растворы образцов и контролей с премиксами пипетированием. Не забывайте менять наконечник автоматической пипетки.

Закройте 96-луночный реакционный планшет соответствующими крышками или оптической клейкой пленкой. Если вы используете реакционные пробирки, убедитесь, что они подходят для использования в амплификаторах с детекцией в режиме реального времени.

Центрифугируйте 96-луночный реакционный планшет в центрифуге с ротором для микротитровального планшета в течение 30 секунд со скоростью примерно 1000 x g (~ 3000 об / мин).

5.4 Протокол амплификации

Для получения основной информации о настройке и программировании различных инструментов ПЦР в режиме реального времени, пожалуйста, обратитесь к руководству пользователя соответствующего инструмента.

Установите следующий температурный профиль и считывание сигнала в каналах FAM и VIC:

Шаг	Температура	Время	Количество циклов
Обратная транскрипция	45 °C	15 мин	1
Предварительная инкубация	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	10 с	45
Отжиг и элонгация*	56 °C	30 с	

* шаг считывания сигнала

6. Анализ и интерпретация данных:

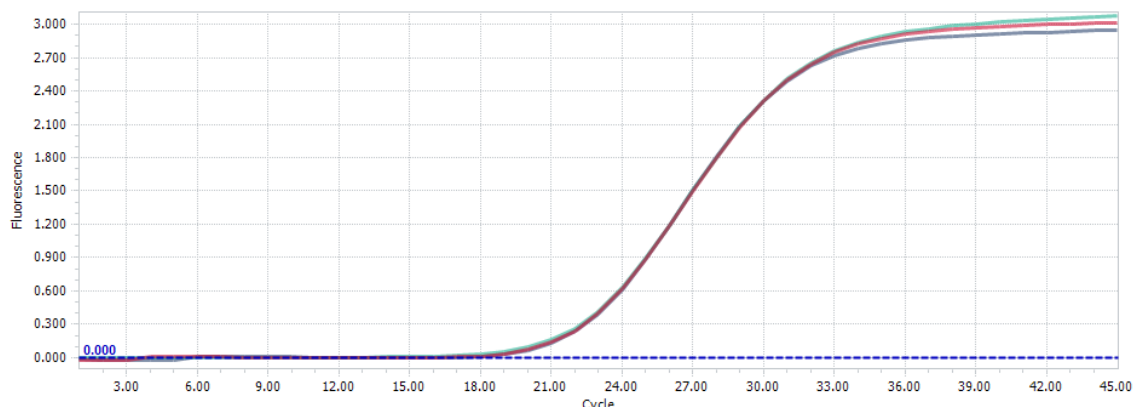
Тест считается успешным, если эффективно и корректно прошли обе стадии: выделения РНК и ПЦР.

ПЦР прошла успешно и данные являются достоверными, при выполнении следующих критериев:

- в отрицательном контроле сигнал в канале FAM Ct > 37 цикла и в канале VIC Ct > 40 цикла или отсутствуют;
- в положительном контроле в канале FAM сигнал в районе Cq 18-22, в канале VIC - отсутствует или появляется не ранее 40 цикла.

Эффективность стадии выделения оценивается для каждой пробы индивидуально по присутствию в ячейке сигнала VIC. Если сигнал в канале VIC отсутствует или превышает значение Cq более 34, следовательно, выделение прошло неудачно, и тестирование образца необходимо повторить, начиная со стадии выделения.

Результат детекции позитивного контроля гена N:



Проба	FAM, Cq	VIC, Cq	Интерпретация
Отрицательный контроль	-(Cq>37)	-(Cq>40)	Данные ПЦР достоверны.
	Cq<37	-(Cq>40)	Возможна контаминация. Повторить стадию ПЦР для всех образцов из анализа.
	-(Cq>37)	Cq<40	Возможна контаминация мРНК. Повторить стадию ПЦР для всех образцов из анализа.
	Cq<37	Cq<40	Контаминация системы детекции. Взять новые реактивы и повторить анализ для всех образцов из постановки.
Положительный контроль	19 - 22	-(Cq>40)	Тест-система работает корректно.
	-(Cq>37)	-(Cq>40)	Не добавлен положительный контроль или тест система не работает.
	19 - 22	Cq<40	Возможна контаминация мРНК. Провести повторный анализ проб с отрицательным FAM.
Образец	+	+	Проба содержит РНК SARS-CoV-2.
	-	-	Результат теста не валиден. Необходимо повторить экстракцию РНК.
	+	-	Результат теста не валиден. Необходимо повторить экстракцию РНК.

Хранение: при +4 °С - 1 месяц; при -20 °С – 1 год, не более 30 циклов замораживания размораживания для 2х смесь для ОТ-ПЦР-РВ, БиоМастер-микс и растворов праймеров и не более 5 циклов для растворов позитивных контролей.

Транспортировка: в термоконтейнерах с охлаждающими элементами.

Ограничения: использовать только для исследовательских работ!