



## **Набор для определения мутаций в гене 16S рРНК *Mycoplasma genitalium* в позициях 966 и 967**

Кат. № SNP-MG966/967-100

### **Назначение**

Набор предназначен для проведения анализа образцов ДНК с целью выявления замены в позициях 966 и 967 гена 16S рРНК *Mycoplasma genitalium*, приводящей к развитию резистентности к тетрациклинам.

### **Описание**

*Mycoplasma genitalium* – вид паразитических бактерий, вызывающих воспалительные заболевания органов урогенитальной системы – уретрита у мужчин и цервицита у женщин. Данная система способна определить замену нуклеотидов (GG на TT/TC) в позициях 966 и 967 в гене 16S рРНК *Mycoplasma genitalium*. Эффективность системы основана на наличии двух ген-специфичных праймеров и флуоресцентно меченного зонда. Зонд с флюорофором Fam направлен на определения ДНК в исследуемом образце. Зонд с флуорофором HEX направлен на определение дикого типа гена с последовательностью нуклеотидов гена PofB. Чувствительность системы позволяет работать с количеством геномной ДНК от 5 нг.

### **Методика исследования**

Метод обнаружения мутации в гене 16S рРНК *Mycoplasma genitalium* основан на амплификации специфического участка ДНК за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных праймеров и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы. Анализ образца проходит в двух отдельных реакционных смесях параллельно.

### **Материал исследования**

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из биологического образца одним из коммерчески доступных наборов.

## Состав набора

100 анализов в объёме 25 мкл	
БиоМастер UDG HS-qPCR (2×)	2×1,5 мл
20× смесь праймеров (MG966/967)	1×150 мкл
20× смесь праймеров (MG)	1×150 мкл
Отрицательный контроль	1×100 мл
Положительный контроль (MG966/967)	1×100 мкл
Положительный контроль (MG)	1×100 мкл
Стерильная вода	1×1,5 мл

## Проведение исследования

### Протокол выполнения амплификации

#### А) Приготовление реакционных смесей

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

1. Разморозить пробирки с реагентами БиоМастер UDG HS-qPCR (2×), 20× смесь праймеров (MG966/967), 20× смесь праймеров (MG), Отрицательный контроль, Положительный контроль (MG966/967), Положительный контроль (MG) и Стерильную воду- каждую пробирку тщательно перемешать на вортексе.
2. Сбросить капли жидкости со стенок и крышек пробирок, кратковременно открутив их на микроцентрифуге.
3. В отдельной пробирке приготовить две реакционные смеси объемом для необходимого количества образцов (N+1, где N – количество исследуемых образцов с учетом всех контролей).

#### Состав реакционной смеси на 1 пробирку Реакционной смеси 1:

Компонент	Объем
БиоМастер UDG HS-qPCR (2×)	12,5 мкл
20× смесь праймеров (MG),	2,5 мкл
ДНК-матрица	10 мкл
Стерильная вода	До 25 мкл

#### Состав реакционной смеси на 1 пробирку Реакционной смеси 2

Компонент	Объем
БиоМастер UDG HS-qPCR (2×)	12,5 мкл
20× смесь праймеров (MG966/967)	2,5 мкл
ДНК-матрица	10 мкл
Стерильная вода	До 25 мкл

4. Поместить тонкостенные пробирки на штатив «рабочее место», добавить отдельным наконечником реакционной смеси в каждую. Промаркировать пробирки.
5. Добавить соответствующую ДНК-матрицу (Положительные контроли, Отрицательный контроль или Образец) в Реакционную смесь 1 и Реакционную смесь 2 отдельными наконечниками.

#### Контроли этапа ПЦР:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – отрицательный контрольный образец;

- б) положительный контроль ПЦР (MG)– положительный контрольный образец, подтверждающий наличие амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* в образце;
- в) положительный контроль ПЦР (MG966/967) – положительный контрольный образец, подтверждающий наличие ДНК дикого типа *Mycoplasma genitalium* в образце.
6. Добавить отдельными наконечниками в пробирки с готовой реакционной смесью тестовые и контрольные образцы.
7. Осторожно перемешать без образования пузырей и сбросить капли, используя центрифугу (при этом необходимо использовать специальный ротор для используемого пластика).

### Б) Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

1. Включить амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».
2. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки реакционного модуля прибора (лунки пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).
3. Запрограммировать прибор для выполнения программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала следуя алгоритму программного обеспечения.

Использовать каналы с длиной волны света (возбуждение / детекция)

- 470+15 нм / 520+15 нм – зеленый спектр (Fam)
- 520+10 нм / 558+11 нм – желтый спектр (VIC/HEX)

Задать следующие параметры эксперимента:

Шаг	Темп-ра, °C	Время инкубации	Кол-во циклов	Измерение флуоресценции
Деконтаминационная обработка	50	2 мин	1	-
Предварительная денатурация	95	3 мин	1	-
Денатурация	95	10 сек		-
Отжиг	60	30 сек	45	Fam, VIC/HEX

### В) Интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, **отрицательным** в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения *Ct* или *Cq*), и **сомнительным** во всех других случаях. При наличии сомнительного результата следует повторить проведение анализа, начиная со стадии ПЦР.

**Принцип интерпретации результатов следующий:**

**Важно!** Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, только если получены правильные результаты для контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций.

### Таблица оценки результатов контрольных реакций

Контроль	Контролируемый этап	Значение граничного порогового цикла Ct
К-	П	Отсутствует или >38
К+ (MG)	Амплификация ДНК <i>M. genitalium</i>	≤ 27
К+ (MG966/967)	Амплификация ДНК дикого типа <i>M. genitalium</i>	≤ 27

На первом этапе анализа определяют положительные образцы по каналу для флуорофора Fam, на котором регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Mycoplasma genitalium*.

– образец считается **отрицательным** по наличию ДНК *Mycoplasma genitalium*, если на канале Fam отсутствует значение порогового цикла Ct или оно превышает 38;

– образец считается **положительным** по наличию ДНК *Mycoplasma genitalium*, если на канале Fam значение Ct присутствует и не превышает 38.

На втором этапе анализа среди положительных образцов определяют положительные образцы по каналу для флуорофора HEX, на котором регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК дикого типа *Mycoplasma genitalium*:

– образец считается **положительным** (резистентным) по наличию мутации, если на канале HEX отсутствует значение порогового цикла Ct;

– образец считается **отрицательным** (не резистентным) по наличию мутации, если на канале HEX значение Ct присутствует и не превышает 38.

### Таблица оценки результатов для исследуемых образцов

Значение Ct по каналу Fam	Значение Ct по каналу Hex	Интерпретация
Отсутствует или >38	Отсутствует	В образце <b>отсутствует</b> ДНК <i>M. genitalium</i>
<38	<38	В образце <b>присутствует</b> ДНК <i>M. genitalium</i> <b>без мутации в гене PorB</b>
<38	Отсутствует	В образце <b>присутствует</b> ДНК <i>M. genitalium</i> <b>с мутацией в гене PorB</b>
Отсутствует или >38	<38	<b>Сомнительный</b> результат, следует повторить ПЦР

### Внимание!

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (К+) по каналу Fam значение Ct отсутствует, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Mycoplasma genitalium*, начиная с этапа экстракции ДНК.

2. Если для отрицательного контроля ДНК (К-) по каналу Fam получено значение Ct <38, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Mycoplasma genitalium*, начиная с этапа экстракции ДНК.

### Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света: при +4 °С – 3 недели; при -20 °С – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

### Условия транспортировки

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами. Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.