



Система для детекции РНК вируса SARS-CoV-2 (del69-70)

1. Описание

Система детекции вируса SARS-CoV-2 (del69-70) - это набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro* и идентификации **делеции 69-70 в S гене** вируса, основанный на технологии одношаговой ОТ-ПЦР в реальном времени.

Набор включает мультиплексную систему праймеров и зондов, специфичную к последовательности **гена S**. Система включает два зонда, которые позволяют идентифицировать варианты вируса с мутацией **del69-70**.

Технология ОТ-ПЦР в реальном времени использует реакцию обратной транскрипции (ОТ) для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) по матрице РНК и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации и детекции последовательностей-мишеней с помощью специфических праймеров и флуоресцентных 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 S/S(del69-70)	1 × 620 мкл
Позитивный РНК-контроль S	1 × 200 мкл
Позитивный РНК-контроль S (del69-70)	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:**

в канале FAM – зонд, специфичный к варианту без мутации в гене S,
HEX/VIC/TAMRA – зонд, специфичный к вариантам с мутацией **del69-70**.

5. Проведение эксперимента

5.1 Подготовка образца:

Исходным материалом для исследований с использованием **Системы детекции вируса SARS-CoV-2 (del69-70)** является РНК, выделенная из биологического образца, с **подтвержденным содержанием РНК вируса SARS-CoV-2**. Набор может быть использован для скрининга и выявления вариантов вируса SARS-CoV-2 с **делецией 69-70 в S гене** среди положительных образцов, которые ранее прошли этап проверки выделения РНК и наличия РНК вируса SARS-CoV-2.

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 последующего этапа ОТ-ПЦР должна быть проверена и подтверждена пользователем самостоятельно.

Для первичного скрининга образцов рекомендуем:

- для выявления РНК вируса SARS-CoV-2:

- Система для детекции РНК вируса SARS-CoV-2 (ген N) (CDS-003N-200)
<https://biolabmix.ru/catalog/COVID-19/sistema-dlya-deteksii-rnk-virusa-sars-cov-2-gen-n/>

- для выделения вирусной РНК:

- Набор 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»).
- Набор реагентов для выделения РНК коронавируса SARS-CoV-2 из мазка/соскоба эпителиальных клеток на магнитных частицах (с РУ) MC21-100/MC21-100-MR.
<https://biolabmix.ru/catalog/COVID-19/>

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 S/S(UK)	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 приготовленного премикса в зависимости от стадии тестирования.

Добавить по 5,0 мкл раствора образца (раствор после выделения РНК) и контроли (положительных и отрицательного) в соответствующие ячейки, содержащие премиксы с системой праймеров и зондов. **Каждая постановка должна обязательно содержать по два положительных контроля: «Позитивный РНК-контроль S» и «Позитивный РНК-контроль S(UK)».**

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*	61 °C	30 с	

* шаг считывания сигнала

6. Анализ и интерпретация данных:

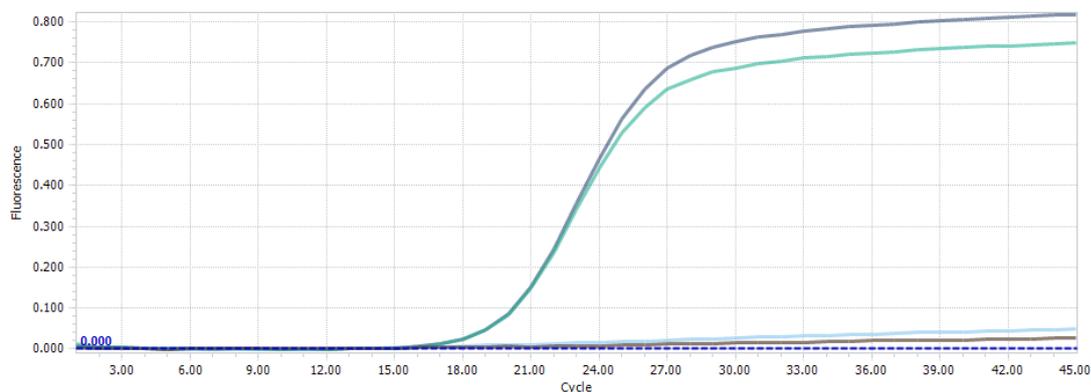
Тест считается успешным, если эффективно и корректно прошли обе стадии: выделения РНК и ПЦР.

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

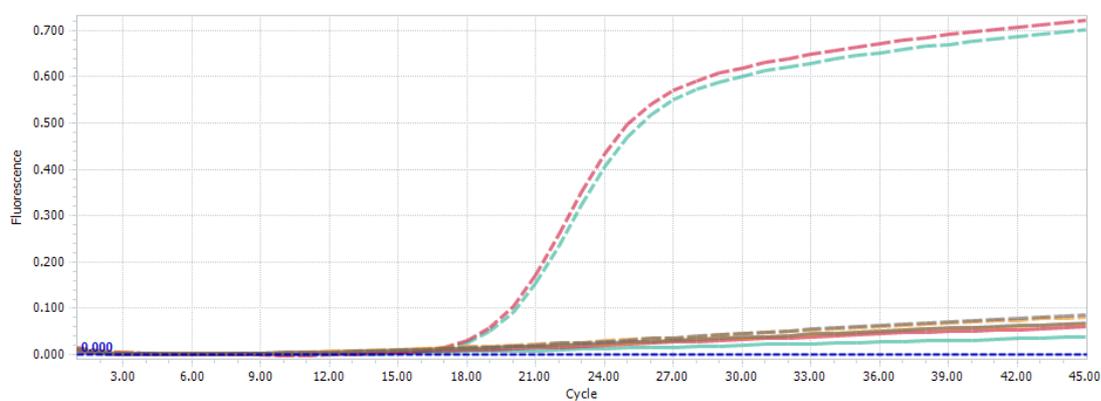
- в отрицательном контроле сигнал в канале FAM Ct > 40 цикла и в канале VIC Ct > 40 цикла или отсутствуют;
- в **Позитивный РНК-контроль S** в канале FAM сигнал в районе Cq 18-22, в канале VIC - отсутствует или появляется не ранее 40 цикла,
- в **Позитивный РНК-контроль S(UK)** в канале FAM сигнал отсутствует или появляется не ранее 40 цикла, в канале VIC - в районе Cq 18-22.



Результат детекции позитивного контроля гена S:



Результат детекции позитивного контроля гена S del69-70:



Хранение: при +4 °С - 1 месяц; при -20 °С – 1 год, не более 30 циклов замораживания размораживания для 2× 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!