## 1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор предназначен для постановки реакции секвенирования по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно-меченых дидезоксинуклеотидтрифосфатов и последующим разделением сиквенс-продуктов методом капиллярного электрофореза.

## 2. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят инструкция по применению, паспорт-вкладышь (паспорт ОТК) и следующие компоненты:

Набор на 24 реакции:

– 2,5х реакционный премикс, 1 пробирка, (192,0±3,0) мкл.;
– 5х реакционный буфер, 1 пробирка, (300,0±5,0) мкл.;
– раствор контрольной ДНК, 1 пробирка, (5,0±0,5) мкл.;
– раствор контрольного праймера, 1 пробирка, (5,0±0,5) мкл.

Набор на 100 реакций:

– 2,5х реакционный премикс, 1 пробирка, (800,0±5,0) мкл.;
– 5х реакционный буфер, 1 пробирка, (500,0±5,0) мкл.;
– раствор контрольной ДНК, 1 пробирка, (10,0±0,5) мкл.;
– раствор контрольного праймера, 1 пробирка, (10,0±0,5) мкл.

Набор на 1000 реакций:

– 2,5х реакционный премикс, 5 пробирок, (8000,0±5,0) мкл.;
– 5х реакционный буфер, 2 пробирки, (4000,0±5,0) мкл.;
– раствор контрольной ДНК, 1 пробирка, (10,0±0,5) мкл.;
– раствор контрольного праймера, 1 пробирка, (10,0±0,5) мкл.

## 3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с буфером следует надевать спецодежду (халаты) по ГОСТ 12.4.131 или ГОСТ 12.4.132 и одноразовые резиновые перчатки по ГОСТ 3.

3.2 Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны и периодичность контроля должны соответствовать требованиям гигиенического норматива «Показатели безопасности и безвредности микроорганизмов-продуцентов, микробных препаратов и их компонентов, вредных веществ в воздухе рабочей зоны и на кожных покровах работающих», утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 25.01.2021 г. № 37.

3.3 Утилизация отработанного буфера должна проводиться в соответствии с законом Республики Беларусь от 20 июля 2007 г. «Об обращениях с отходами».

3.4 Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с образцами ДНК.

3.5 Избегать контакта с кожей и слизистыми оболочками. При контакте, промыть большим количеством проточной воды.

## 4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для использования набора при постановке реакции секвенирования по методу Сэнгера необходимо:

1. Набор полуавтоматических пипеток переменного объема, позволяющих отбирать объемы жидкостей 0,5-10 мкл.; 2-20 мкл. и 10-100 мкл.
2. Пластиковые наконечники для полуавтоматических пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до100 мкл.
3. Полипропиленовые пробирки вместимостью 0,5 мл. с закрывающимися плоскими крышками.
4. Отдельные халаты и одноразовые нитриловые перчатки без талька;
5. Морозильная камера, отрегулированная на температуру от минус 18 до минус 24 $^0$C.

## 5. ПОРЯДОК ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАБОРА

Эксплуатацию набора следует проводить при комнатной температуре. Предварительно, перед использованием набора, его компоненты следует разморозить и перемешать каждый компонент. В случае наличия осадка в любом из компонентов набора следует заменить данный компонент.

В условиях ПЦР бокса разморозьте 2,5х реакционный премикс и 5х реакционный буфер. Перемешайте реагенты на центрифуге-вортексе и осадите содержимое в течение 5-10с при 500-700g.

Для постановки реакции амплификации смешайте компоненты набора. Общий объем смеси для одной реакции составляет 20 мкл, однако его можно уменьшить до 10 мкл.

При разведении реакционного премикса до 1х значения, в смеси для амплификации не используется 5х реакционный буфер. При данных условиях могут нарабатываться избыточные количества сиквенс продуктов, что приводит к избыточным значениям флуоресценции в ходе разделения продуктов реакции на генетическом анализаторе. С целью экономии реагентов, рекомендуется снизить количество 2,5х реакционного премикса при подготовке смеси для амплификации, при этом в смесь следует добавить 5х реакционный буфер. Зависимость количества добавляемого 5х реакционного буфера можно рассчитать по формуле 1:

$$Vбуф=((Vреак/2,5)-Vпремикс)/2 \quad (1)$$

где Vбуф – количество 5х реакционного буфера, которое следует добавить;

Vреак – общий объем смеси для амплификации;

Vпремикс – количество добавленного 2,5х реакционного премикса

Пример такой смеси для амплификации – количества добавляемых реагентов - приведен в Таблице 1.

Таблица 1 – Количества добавляемых компонентов в смесь для амплификации

| Компонент | Объем 20 мкл. | Объем 10 мкл. | Объем 20 мкл.* | Объем 10 мкл.* |
|---|---|---|---|---|
| 2,5х реакционный премикс | 8 мкл | 4 мкл | 1 мкл | 1 мкл |
| 5х реакционный буфер | - | - | 3,5 мкл | 1,5 мкл |
| Праймер (3,2 – 5 пкмоль/мкл) | 1 мкл | 1 мкл | 1 мкл | 1 мкл |
| ДНК | см. таблицу 2 | см. таблицу 2 | см. таблицу 2 | см. таблицу 2 |
| Деионизированная вода | до 20 мкл | до 10 мкл | до 20 мкл | до 10 мкл |

Примечание* - указаны количества компонентов, если в смесь для амплификации добавить 1 мкл 2,5х реакционного премикса.

Таблица 2. Рекомендуемое количество ДНК

| ДНК-матрица | Количество, нг |
|---|---|
| ПЦР-фрагменты 100-200 п.н. | 3-10 нг |
| ПЦР-фрагменты 500-100 п.н. | 5-20 нг |
| ПЦР-фрагменты 1000-2000 п.н. | 10-40 нг |
| ПЦР-фрагменты >2000 п.н. | 20-50 нг |
| Плазмидная ДНК | 150-300 нг |
| Геномная ДНК бактерий | 2-3 мкг |

При постановке контрольной реакции в смесь для амплификации добавьте 1 мкл. раствора контрольной ДНК и 1 мкл. раствора контрольного праймера. 0,2 мл. стрипованные пробирки с готовой смесью для амплификации закрыть крышками. При использовании 96-луночного планшета, лунки заклеить адгезивной пленкой с использованием аппликатора. Содержимое перемешать путем встряхивания или с помощью вортекса, а после осадитьна центрифуге в течение 10 с. при 500-700 гр.

Поместите пробирки или планшеты в термоциклер. Выберите и запустите следующий протокол:

| | | |
|---|---|---|
| денатурация | 96 ºС, 45 сек. | 1 цикл |
| элонгация/удлинение | 96 ºС, 10 сек. → 50 ºС, 5 сек. → 60 ºС 4 мин. | 25 циклов |
| хранение | 4 ºС | ∞ |

После завершения программы амплификации, следует очистить сиквенс продукты от компонентов смеси для амплификации. Приступить к очистке можно сразу или отложить на более поздний срок – при этом смесь для амплификации, содержащую сиквенс продукты, следует хранить в защищенном месте при +4°С в течение ночи или при –20°С при более длительном хранении.

## 6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

1. Набор должен храниться при температуре минус (18 - 24) ºС в плотно закрытой таре в защищённом от света месте в течение всего срока годности.

2. Не смешивать компоненты набора из разных партий.

3. Для отбора и добавления компонентов набора рекомендуется использовать автоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованными на точность по значению средней дозы и сходимость результатов пипетирования.

4. Во избежание контаминации рекомендуется вносить компоненты набора наконечниками с аэрозольным барьером.

5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

6. При несоблюдении указаний по применению, производитель не несёт ответственности за результаты анализа.

7. Срок годности набора 12 месяцев.