Набор для выявления ДНК возбудителя американского гнильца пчел

Артикул: Бак-9-100 (на 100 реакций)

Компоненты набора

Компоненты	Объем, мкл
Микс ПЦР	1500 мкл
S-Taq полимераза	55 мкл
Положительный контрольный образец (КО+)	360 мкл

Область применения

Набор предназначен для выявления ДНК возбудителя американского гнильца медоносных пчел (*Paenibacillus larvae*) с помощью ПЦР в реальном времени.

Чувствительность набора до 10^3/мл геном эквивалентов в исходной пробе.

Набор рассчитан на проведение 100 реакций, включая контроли.

Для применения в ветеринарии.

Гарантия

Фрактал Био гарантирует изготовление всех продуктов согласно описанию в руководстве. Покупатель должен определить соответствие продукта для конкретного его использования. Если продукт не дает заявленного результата по любой причине, за исключением неправильного использования, мы бесплатно произведем замену продукта или вернем покупателю его полную стоимость. Мы сохраняем за собой право изменять или модифицировать любой продукт в целях улучшения его качеств и дизайна.

Если у вас возникли вопросы по применению продукта или оценке результата, вы можете обращаться в Службу технической поддержки.

Описание

Процедура анализа состоит из двух этапов: 1) проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в реальном времени, 2) анализ результатов. Для детекции и анализа результатов используются два канала, имеющиеся практически во всех амплификаторах для ПЦР в реальном времени.

1. Канал **R6G** (аналоги: **Joe/Vic/Tet/Hex**): для детекции ДНК *Paenibacillus larvae*; макс. поглощения 530 нм, макс. флуоресценции 570 нм.
2. Канал **FAM** (аналоги: **Sybr Green/Green**): для детекции внутреннего контроля (ДНК насекомых); макс. поглощения 495 нм, макс. флуоресценции 520 нм**.**

Необходимое оборудование и материалы

Организация работы ПЦР-лаборатории должна соответствовать методическому указанию МУ 1.3.2569-09.

Для работы с набором необходимы следующие оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

- Микроцентрифуга, вортекс
- Амплификатор для ПЦР в реальном времени
- Ламинарный и ПЦР-бокс
- Набор дозаторов, одноканальных с переменным объемом
- Одноразовые наконечники с фильтрами для дозаторов
- Одноразовые полипропиленовые микропробирки объемом 0,2-0,5 и 1,5-2 мл
- Штативы для наконечников и микропробирок
- Халат и одноразовые перчатки
- Емкость для сброса использованного расходного материала

ООО «Фрактал Био»
190020, г. Санкт-Петербург, ул. Бумажная, д. 17
info@fractalbio.com
www.fractalbio.com
(812) 495-96-95

Дата изменения: 13.04.2022

Меры предосторожности

При работе с наборами необходимо соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981) и СП 1.3.2322-08, СП 1.3.1285-03.

При приготовлении смесей используйте индивидуальные средства защиты. Компоненты набора не обладают токсическими и другими свойствами, за счет которых возможно негативное воздействие на человека.

Важные замечания

1. Приготовление реакционных смесей для ПЦР необходимо проводить в ПЦР-боксе.
2. При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free» и «RNase-free».
3. Для приготовления смесей и добавления нуклеиновых кислот используйте только наконечники с фильтрами.
4. Работать только в одноразовых перчатках.
5. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы, должны быть строго стационарным.
6. Использованный расходный материал должен сбрасываться в специальную емкость с дезинфицирующим раствором.

Необходимые контрольные образцы

Этап выделения НК:

- Отрицательный контрольный образец (выделение НК из воды)

Этап постановки ПЦР:

- Отрицательный контрольный образец (отрицательный контрольный образец выделения НК)
- Положительный контрольный образец КО+ (входит в состав набора)

Отбор материала

Для исследования используется тотальный пул нуклеиновых кислот, выделенный из пчел и личинок пчел, а также продуктов пчеловодства (мед, воск). Для выделения НК берутся как индивидуальные личинки или пчелы, так и фрагменты расплода в сотах, группы пчел или личинок (10-30 штук) в зависимости от количества материала и цели исследования.

При наличии клинической картины отбираются личинки расплода с признаками заболевания (2-3 штуки).

При анализе на носительство заболевания берут личинок и/или рабочих пчел, обслуживающих расплод (2-3 штуки).

В профилактических целях также можно подвергать анализу продукты пчеловодства или подмор. При анализе пчелиной семьи рекомендуется взять не менее 30-ти пчел или личинок.

Материал от каждой партии отбирается отдельными инструментами в отдельные стерильные емкости. Материал следует хранить не более 10 суток при температуре 2-8°С, более длительное хранение при температуре не выше -16°С.

Выделение НК

Выделение НК из образцов клинического материала может проводиться с помощью наборов, позволяющих выделить одновременно РНК и ДНК. Например, с помощью наборов на основе силики, наборов с микроцентрифужными колонками, наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Мы рекомендуем использовать наборы для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала «ФБиоНуклео» (пр-во Фрактал Био). В основе набора лежит метод выделения НК на микроцентрифужных колонках, что позволяет выделять до 50 мкг нуклеиновых кислот. При использовании набора «ФБиоНуклео» НК рекомендуется элюировать в 100 мкл ЕБ буфера.

При выделении НК необходимо проводить **отрицательный контроль** – выделение НК из воды. Этот же образец следует использовать при постановке ПЦР.

Внутренним контролем является геномная ДНК насекомых.

Подготовка образцов к выделению

Смесь пчел поместите в шприц на 12 мл через верхнее отверстие, предварительно вынув поршень. Вставьте поршень в шприц и спрессуйте пчел до появления черно-коричневой жидкости. Наберите шприцом 1 мл физ.раствора и перемешайте содержимое шприца встряхиванием. Соберите жидкость из шприца в пробирку на 1.5 мл. Для выделения НК используйте 100 мкл жидкости.

Индивидуальную пчелу гомогенизируйте в пробирке с добавлением 0.5 мл физ.раствора и возьмите 100 мкл жидкости.

Кусок воска объемом 0,1 $см^3$ помещается непосредственно в лизирующий буфер и перетирается наконечником.

Мед используется без предварительной подготовки в количестве 100 мкл.

Постановка ПЦР

Отберите необходимое количество микропробирок для ПЦР с учетом контрольных образцов.

1. В отдельной стерильной пробирке (1,5 мл) смешайте входящие в набор Микс ПЦР и S-Taq полимеразу, в указанных ниже пропорциях.

Компонент	На 1 реакцию, мкл	На N реакций, мкл
Микс ПЦР	15	15xN
S-Taq полимераза	0,5	0,5xN

Важно! При добавлении полимеразы обязательно погружайте наконечник в раствор и пипетируйте для полного ее смывания с наконечника пипетки. Полимеразу следует убрать на -20°C сразу после использования.

2. Перемешайте подготовленную смесь на вортексе и осадите капли кратковременным центрифугированием (2-3 сек).
3. После приготовления смеси перенесите по 15 мкл в каждую микропробирку для ПЦР.
4. Внесите в первую микропробирку с ПЦР смесью 10 мкл отрицательного контрольного образца (КО-).
5. В следующие микропробирки добавьте по 10 мкл исследуемых проб.
6. В последнюю микропробирку добавьте 10 мкл положительного контрольного образца (КО+).

Важно! Пробирку с положительным контрольным образцом, входящую в набор, открывайте только после раскапывания и закрытия крышек всех микропробирок с исследуемыми пробами для предотвращения контаминации.

7. Поместите микропробирки в амплификатор и запустите программу амплификации

Температура	Время (сек)	Кол-во циклов
95°C	180	1
60°C	30	40
95°C	10	

В дополнении 1 находится краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификаторов ДТпрайм, ДТлайт (ДНК-технология).

В дополнении 2 находится краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора CFX96 Touch™ (Bio-Rad).

В дополнении 3 находится краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора iQ5 iCycler (BioRad).

В дополнении 4 находится краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора Rotor-Gene 6000 (Qiagen).

Анализ результатов

По каналу R6G регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Paenibacillus larvae*.

По каналу FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации внутреннего контроля. По таблице 1 проверьте значения Ct контрольных образцов.

Таблица 1. Значения Ct для контрольных образцов.

	Канал **FAM**	Канал **R6G**
КО-	нет	нет
КО+	<33	<33

При соответствии значений контрольных образцов, определите Ct исследуемых проб и определите результат по таблице 2 или 3.

Таблица 2. Определение результата анализа исследуемой пробы по значениям Ct в случае исследования пчел или расплода.

Канал **FAM**	Канал **R6G**	Результат
<25	<35	ДНК *Paenibacillus larvae* **обнаружена**
<25	нет	ДНК *Paenibacillus larvae* **не обнаружена**

Важно! Если для исследуемой пробы по каналу FAM Ct>25 и по каналу R6G>35, то полученный результат не является достоверным вследствие низкого содержания выделенных НК.

Если для исследуемой пробы по каналу FAM Ct<25 и по каналу R6G значение Ct 35-40, то полученный результат не является достоверным вследствие возможной контаминации.

Следует повторить анализ с этапа выделения НК.

Таблица 3. Определение результата анализа исследуемой пробы по значениям Ct в случае исследования продуктов пчеловодства.

Канал **FAM**	Канал **R6G**	Результат
<35	<35	ДНК *Paenibacillus larvae* **обнаружена**
<35	нет	ДНК *Paenibacillus larvae* **не обнаружена**

Важно! Если для исследуемой пробы по каналу FAM Ct>35 и по каналу R6G>35, то полученный результат не является достоверным вследствие низкого содержания выделенных НК.

Если для исследуемой пробы по каналу FAM Ct<35 и по каналу R6G значение Ct 35-40, то полученный результат не является достоверным вследствие возможной контаминации.

Следует повторить анализ с этапа выделения НК.

Хранение и стабильность

Срок годности: 12 месяцев.

Температурный режим хранения компонентов набора.

1. Наборы реагентов для этапа ПЦР – при -20°С.
2. Транспортировку набора можно осуществлять всеми видами крытого а. Допускается кратковременное хранение при 2-15°С не более 7 суток.

Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Служба технической поддержки

В случае появления вопросов обращайтесь в службу технической поддержки:
info@fractalbio.com

Дополнение 1

Краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификаторов ДТпрайм, ДТлайт (ДНК-технология).

Выполните пункты 1-7 раздела «Постановка ПЦР» данной инструкции.

1. Включите прибор. Установите микропробирки в термоблок амплификатора.
2. Откройте программу RealTime PCR → выберите режим «Работа с прибором» → выберите номер прибора → подключить.
3. В открывшемся окне в разделе «Протокол» создайте протокол исследования с учетом расположения образцов в матрице термоблока. Выберите каналы детекции: FAM, HEX.

Перейдите в раздел «Запуск программы амплификации». Создайте программу согласно таблице.

Кол-во циклов	Температура	Время (сек)	Детекция
1	95°C	180	–
40	95°C	10	–
	60°C	30	да

4. Выберите объем реакции – 25 мкл.
5. Запустите программу амплификации. Текущее окно заменится на окно «Выполнение программы».
6. После завершения программа автоматически переходит в режим просмотра протокола с результатами оптических измерений. Если программа перешла в режим «Хранение», то нажмите клавишу «Стоп».
7. Выберите метод анализа «Геометрический».
8. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом «Анализ результатов» данной инструкции.

Дополнение 2

Краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификаторов CFX96 Touch™ (Bio-Rad).

Выполните пункты 1-7 раздела «Постановка ПЦР» данной инструкции.

1. Включите прибор. Установите микропробирки в термоблок амплификатора.
2. Откройте программу Bio-Rad CFX Manager. В окне «Startup Wizard» перейдите в режим «User-defined» (режим, определяемый пользователем).
3. В открывшемся окне «Run Setup» перейдите в раздел «Protocol» (Протокол). Для выбора или редактирования существующего протокола прейдите в «Select Existing», либо в «Great New» для создания нового протокола.
4. Заполните протокол программы в соответствии с таблицей ниже.

Кол-во циклов	Температура	Время (сек)	Детекция
1	95°C	180	–
40	95°C	10	–
	60°C	30	да

5. Для детекции ПЦР в реальном времени нажмите клавишу «Add Plate read to step» и выберите этап, на котором будет считывание согласно таблице.
6. Выберите объем образца «Sample Volume» 25 мкл.
7. Перейдите в окно «Plate» (планшет), щелкнув по данной закладке, либо нажав клавишу «Next» в разделе «Protocol». Для редактирования нажмите «Edit Selected».
8. Выберите каналы детекции FAM, HEX.
9. Заполните названия образцов в графе «Sample Name» и сохраните.
10. Перейдите в окно «Start Run» (Запустить эксперимент), щелкнув по данной закладке, либо нажав клавишу «Next» в окне «Protocol».
11. Поставьте галочку «Select All Blocks».
12. Для запуска программы нажмите клавишу «Start Run» и сохраните. Автоматически откроется окно «Run Details».
13. После завершения программы автоматически откроется окно «Data Analysis». Перейдите в верхней панели окна в Setting → Cq Determination Mode → Regression.
14. Полученные Cq для проб используйте для анализа в соответствии с разделом «Анализ результатов» данной инструкции.

Дополнение 3

Краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора iQ5 iCycler (BioRad).

При использовании iQ5 iCycler амплификатора необходимо прогреть блок до запуска ПЦР (примерно 10 минут).

Выполняйте пункты 1-7 раздела «Постановка ПЦР» данной инструкции.

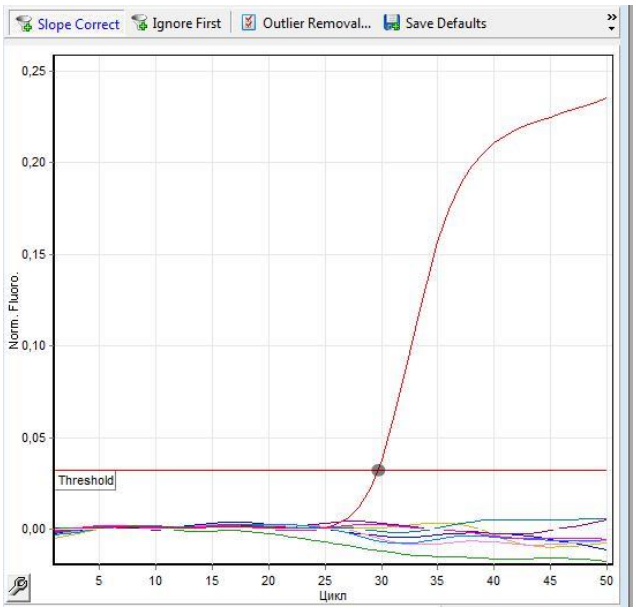
1. Установите микропробирки в термоблок амплификатора и запустите программное обеспечение BioRad iQ5.
2. Отредактируйте настройки плашки в производственном модуле (**Workshop → Setup → Plate →** выберите файл **→ Edit**).
3. Установите параметры.
   - Название эксперимента.
   - Флуорофоры – FAM, HEX.
   - Объем реакции – 25 мкл.
   - Выберите используемый способ герметизации (Seal type): пленка (film)/ выпуклая крышка (domed cap)/ плоская крышка (flat cap).
   - Выберите используемый тип сосуда (Vessel type): планшеты (plates)/ стрипы (strips)/ пробирки(tubes).

     Важно! Выбранные параметры должны соответствовать калибровочным!
   - Задайте расстановку и характеристику микропробирок с помощью пиктограмм.
   - Задайте названия образцам с помощью кнопки **Spreadsheet**. Сохраните созданную конфигурацию планшета, нажав кнопку «Сохранить и выйти из редактора планшета» (**Save & Exit Plate Editing**). Просмотреть созданную конфигурацию можно с помощью кнопки **Plate Summery**.
4. Создайте новый температурный протокол (**Workshop → Setup → Protocol → Selected protocol → Create new**) согласно таблице ниже.

Кол-во циклов	Температура	Время	Детекция
1	95°C	180 сек	–
40	60°C	30 сек	да
	95°C	10 сек	–

5. Нажмите **Save & Exit Protocol Editing** («Сохранить и выйти из редактора протокола»).
6. Нажмите кнопку **Run**, в открывшемся окне установите способ определения фона ячеек – «Постоянные факторы лунок» (Persistent well factors).
7. Запустите программу с помощью кнопки **Begin Run**.
8. После запуска ПЦР откроется окно «Просмотр эксперимента» (**Monitor run**), в котором можно следить за ходом ПЦР в реальном времени.
9. После окончания ПЦР появится окно **Run status**. Для просмотра анализа данных нажмите «Да». Для выхода из программы нажмите «Нет».
10. Установите Threshold – 100. Далее вручную опустите пороговую линию в окне с графиками флуоресценции до уровня начала линейного участка для графика, соответствующего КО+. См. рисунок 1.
11. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом «Анализ результатов» данной инструкции.

Рисунок 1. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для КО+.



Дополнение 4

Краткое руководство по постановке ПЦР и анализу результатов при использовании амплификатора Rotor-Gene 6000 (Qiagen).

Выполняйте пункты 1-7 раздела «Постановка ПЦР» данной инструкции.

1. Установите микропробирки в амплификатор и уравновесьте ротор.
2. Запустите программное обеспечение к амплификатору Rotor-Gene 6000.
3. Создайте новый протокол (**New Run → Advanced → New**):
   - установите использующийся тип ротора;
   - установите использующийся тип пробирок;
   - задайте объем реакционной смеси (**Reaction volume**) – 25 мкл.
   - измените температурного профиля (кнопка **Edit profile…**) согласно таблице ниже.

Стадия	Температура	Время	Считывание
Hold	95°C	180 сек	–
Cycling 40	60°C	30 сек	Acquiring to Cycle A on Green, Yellow
	95°C	10 сек	Don't acquire

Важно! При изменении температурного профиля для каждого шага должен быть задан Timed Step, а флажки для параметров Long Range и Touchdown отсутствовать.

4. Установите оптимизацию (**Gain optimisation → Optimise acquiring → Perform optimization before 1st acquisition)**:
   - для канала канала Yellow установите параметры Min Reading – 5Fl и Max Reading 10Fl;
   - для канала Green установите параметры Min Reading – 5Fl и Max Reading 10Fl.
5. В окне **Summery** проверьте корректность настроек и запустите амплификацию (**Start run**)
6. После запуска ПЦР, отредактируйте положение микропробирок в роторе (**Edit samples…**).
7. Номера строк в списке образцов соответствуют номерам ячеек амплификатора.
8. После завершения амплификации проведите анализ результатов по каждому каналу в отдельности (**Analysis → Quantitation → Cycling A. Yellow** (Green)т **→ Show**)
9. Установите следующие параметры:
   - отмените **Auto-find threshold**;
   - активируйте кнопки **Dynamic tube** и **Slope correct**;
   - выберите линейную шкалу графического изображения (**Linear scale**; если эта шкала активна по умолчанию, то в нижней части окна находится кнопка **Log Scale**);
   - нажав кнопку **More settings**, установите NTC threshold – 10%.
10. В разделе CT calculation установите **Threshold** – 0,1. Далее вручную опустите пороговую линию в окне с графиками флуоресценции до уровня начала линейного участка для графика, соответствующего КО+. См. рисунок 2.
11. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом «Анализ результатов» данной инструкции.

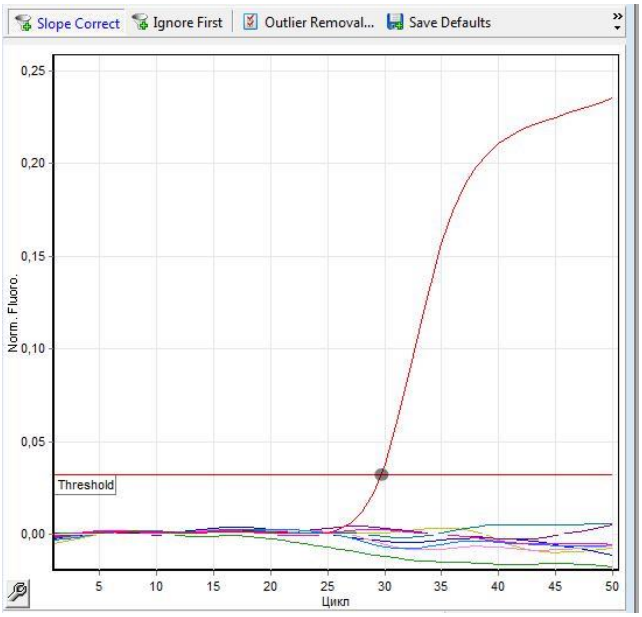



Рисунок 2. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для КО+.