



Набор для выявления ДНК  
*Chlamydia psittaci*

(Бак-8-50/100, на 50/100 реакций)

Дата изменения: 20.03.2017

# Содержание

Компоненты набора.....	3
Область применения .....	3
Гарантия .....	3
Описание .....	4
Необходимое оборудование .....	4
Меры предосторожности .....	5
Важные замечания.....	5
Необходимые контрольные образцы.....	5
Отбор материала.....	6
Выделение ДНК.....	6
Постановка ПЦР .....	6
Анализ результатов .....	8
Хранение и стабильность.....	10
Дополнение 1. ....	11
Дополнение 2. ....	13

## Компоненты набора

Компоненты	количество	
	50 реакций	100 реакций
Микс ПЦР	750мкл	1500мкл
S-Taq полимераза	27мкл	55 мкл
Контрольный образец (КО+)	180мкл	360 мкл

## Область применения

Набор предназначен для выявления ДНК *Chlamydia psittaci* (*Clamydophila psittaci*), выделенной из биологических образцов, с помощью ПЦР в реальном времени. Чувствительность набора составляет до  $10^3$ /мл геном эквивалентов в исходной пробе. Набор рассчитан на проведение 50/100 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 (см. на обороте).

## Описание

Процедура анализа состоит из двух этапов: 1) проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального 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**): макс. поглощения 530 нм, макс. флуоресценции 570 нм; детекция ДНК *Chlamydia psittaci*.
- 2) Канал **FAM** (аналог - **Sybr Green**): макс. поглощения 495 нм, макс. флуоресценции 520 нм; детекция внутреннего контроля (геномная ДНК животных).

## Необходимое оборудование

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

## **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 счёт которых возможно негативное воздействие на человека.

## **Важные замечания**

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

## **Необходимые контрольные образцы**

**Этап выделения ДНК:**

- Отрицательный контрольный образец (выделение ДНК из воды)

**Этап постановки ПЦР:**

- Отрицательный контрольный образец (вода или продукт выделения ДНК из воды)
- Положительный контрольный образец КО+ (входит в состав набора)

## **Отбор материала**

Для исследования используют ДНК, выделенную из мазков со слизистых оболочек (конъюнктивы, ротоглотки, клоаки), фекалий, а также патологоанатомического материала (легкие, селезенка, печень и др.). Материал от каждого животного (птицы) отбирается отдельными инструментами в отдельные стерильные ёмкости. Материал следует хранить не более 10 суток при температуре 2-8 °С, более длительное хранение при температуре не выше -16 °С.

## **Выделение ДНК**

Выделение ДНК из образцов биологического материала может проводиться различными методами, 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” (Фрактал Био). В основе набора лежит метод выделения ДНК на микроцентрифужных колонках, что позволяет выделять до 10 мкг нуклеиновых кислот. При использовании набора “ФБиоНуклео”, ДНК рекомендуется элюировать в 100 мкл ЕБ буфера.

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

Внутренним контролем является геномная ДНК животного.

## **Постановка ПЦР**

1. Отберите необходимое количество микропробирок для ПЦР (0,2-0,5 мл) с учётом контрольных образцов.

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

Компонент	На 1 реакцию (мкл)	На N реакций (мкл)
<b>Микс ПЦР</b>	15	15xN
<b>S-Тақ полимеразы</b>	0,5	0,5xN

**Важно!**

При добавлении S-Тақ полимеразы обязательно погружайте носик в раствор и пипетируйте для полного смывания фермента с носика пипетки. S-Тақ полимеразу следует убрать на -20°C сразу после добавления.

3. Перемешайте подготовленную смесь на вортексе и осадите капли кратковременным центрифугированием (2-3 сек).

4. После приготовления смеси перенесите по 15 мкл в каждую микропробирку для ПЦР.

5. Внесите в первую микропробирку с ПЦР смесью 10 мкл отрицательного контрольного образца (КО-).

6. В следующие микропробирки добавьте по 10 мкл исследуемых проб.

7. В последнюю микропробирку добавьте 10 мкл контрольного образца (КО+).

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

8. 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 амплификатора iQ5 iCycler (BioRad).

В дополнении 2 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 *Chlamydia psittaci*.

По каналу FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации внутреннего контроля.

По таблице 1 проверьте значения Ct контрольных образцов.

	Канал FAM	Канал R6G
КО-	> 40	> 40
КО+	< 35	< 35

Таблица 1. Значения Ct для контрольных образцов.

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

Канал FAM	Канал R6G	Результат
< 35	< 35	<b>ДНК <i>Chlamydia psittaci</i> обнаружена</b>
< 35	> 40	<b>ДНК <i>Chlamydia psittaci</i> не обнаружена</b>

Таблица 2. Определение результата исследуемой пробы по значениям Ct.

### Важно!

При исследовании материала от птиц значения по каналу Fam всегда будет более 35 либо, то есть не определяться. Повторять исследования следует если значения по каналу R6G лежат в диапазоне от 35 до 40.

Если для исследуемой пробы по каналу FAM  $C_t > 35$  и по каналу R6G  $> 35$ , то полученный результат не является достоверным вследствие низкого содержания выделенной ДНК.

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

Следует повторить анализ с этапа выделения ДНК, взяв в несколько раз больше биоматериала.

### Определение титра

В случае если ДНК возбудителя не обнаружена, то титр  $T=0$ .



В случае если ДНК возбудителя обнаружена, то Вы можете рассчитать усредненное содержание бактерий относительно клеток животного по следующей формуле:

$$T = N / M = 2^{(m-n)}$$

Где: T – искомый титр, N – количество копий ДНК *Chlamydia psittaci*, M – количество клеток животного, m – Ct, определенное по каналу FAM; n – Ct определенное по каналу R6G.

Полученный значение и есть отношение количества клеток бактерий к количеству клеток животного. Результат лучше представить в виде простой дроби. Для упрощения перевода результата в простую дробь после того как Вы вычислили  $2^{(m-n)}$  полученное значение необходимо округлить до первой значащей цифры. Если полученное значение больше 1, то можно не округлять, а только отбросить знаки после запятой. После чего по таблице 3 определить соотношение.

Также для расчета титров Вы можете использовать программу в разделе Техподдержка на нашем сайте ([fractalbio.com](http://fractalbio.com)).

В случае если ДНК возбудителя обнаружена, но Ct для ВКО не определено (Ct > 40) высчитать титр невозможно, но он составляет не менее 1000 инфекционных частиц на 1 клетку животного.

0,10 = 1/10	0,01 = 1/100	0,001 = 1/1000
0,20 = 1/5	0,02 = 1/50	0,002 = 1/500
0,30 ~ 1/3	0,03 ~ 1/33	0,003 ~ 1/333
0,40 ~ 1/3	0,04 = 1/25	0,004 = 1/250
0,50 = 1/2	0,05 = 1/20	0,005 = 1/200
0,60 ~ 1/2	0,06 ~ 1/17	0,006 ~ 1/165
0,70 ~ 1/1	0,07 ~ 1/15	0,007 ~ 1/143
0,80 ~ 1/1	0,08 ~ 1/13	0,008 = 1/125
0,90 ~ 1/1	0,09 ~ 1/11	0,009 ~ 1/111

**Таблица 3.** Перевод результатов в простые дроби.

### Примеры определения титра

Ct по каналу FAM – 29;

Ст по каналу R6G – 31,6

$$T = 2^{(29-31,6)} = 2^{-2,6} = 0,16 \sim 0,2$$

После округления получаем 0,2, что при записи в виде простой дроби = 1/5. То есть 1 инфекционная частица на 5 клеток животного.

Ст по каналу FAM – 29;

Ст по каналу R6G – 23,4

$$T = 2^{(29-23,4)} = 2^{5,6} = 48,5 \sim 48/1$$

То есть 48 инфекционных частиц на 1 клетку животного.

### **Комментарии:**

Определение титра Т с точностью в несколько знаков не имеет практического смысла, так как эти значения могут варьировать в зависимости от того, как была взята проба, с какого места и т.д., поэтому можно округлять. Существенное значение имеет порядок Т (10/1; 1/1; 1/10; 1/100; 1/1000), который характеризует количество возбудителя по отношению к клеткам животного.

Когда Ст для ВКО (канал Fam), больше 33, то титры меньше 1/100 определяться не будут. Наиболее оптимальным мы считаем значения Ст для ВКО в районе 26-29.

### **Хранение и стабильность**

Срок годности 12 месяцев.

Наборы реагентов для этапов обратной транскрипции и ПЦР – при -20 °С.

Транспортировку набора можно осуществлять всеми видами крытого транспорта. Допускается кратковременное хранение при 2-15 °С не более 7 суток.

Набор с истёкшим сроком годности использованию не подлежит.

### **Служба технической поддержки**

В случае появления вопросов обращайтесь в службу технической поддержки: [technic@fractalbio.com](mailto:technic@fractalbio.com)

## Дополнение 1.

### 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).

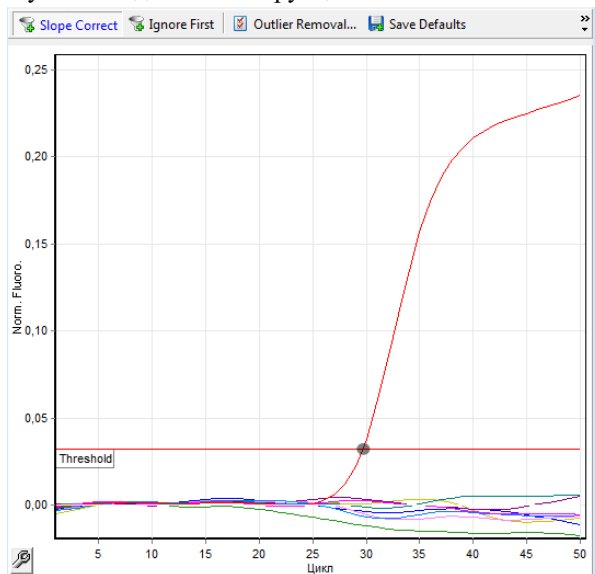
Выполняйте пункты 1-7 раздела Постановка ПЦР данной инструкции.

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**). Установите:
  - Название эксперимента
  - Флуорофоры – FAM, HEX
  - Объём реакции – 25 мкл
  - Выберите используемый способ герметизации (Seal type) – плёнка (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 Summary**.
3. Создайте новый температурный протокол (**Workshop** → **Setup**→ **Protocol**→ **Selected protocol**→ **Create new**) согласно таблице:

Количество циклов	Температура	Время	Детекция флуоресценции по каналам FAM/HEX
1	95 °C	180 сек	нет
40	60 °C	30 сек	да
	95 °C	10 сек	нет

Нажмите **Save & Exit Protocol Editing** (Сохранить и выйти из редактора протокола).

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



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

## Дополнение 2.

### 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 объём реакционной смеси (Reaction volume) – 25 мкл.
  - Измените температурного профиля (кнопка **Edit profile...**) согласно таблице:

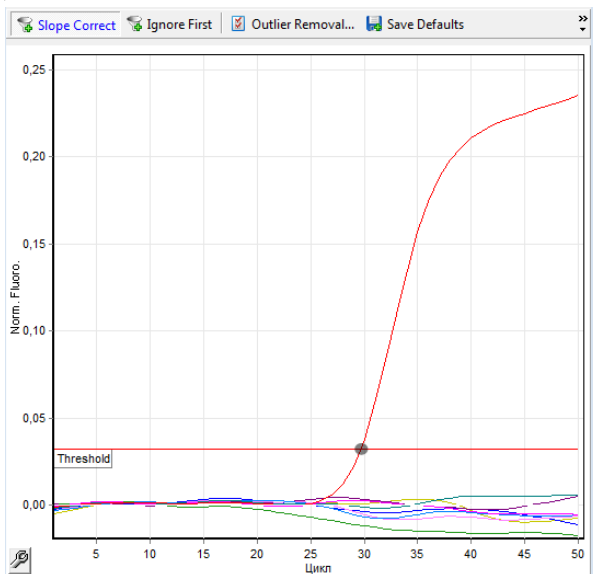
Стадия	Температура	Время	Считывание
<b>Hold</b>	95 °C	180 сек	
<b>Cycling</b> This cycle repeats 40 times	60 °C	30 сек	Acquiring to Cycle A on Green, Yellow
	95 °C	10 сек	Don't acquire

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

- Установите оптимизацию (**Gain optimisation → Optimise acquiring → Perform optimization before 1<sup>st</sup> acquisition**):  
Для канала Yellow установите параметры Min Reading – 5F1 и Max Reading 10F1  
Для канала Green установите параметры Min Reading – 15F1 и Max Reading 20F1
4. В окне Summerу проверьте корректность настроек и запустите амплификацию (**Start run**)
  5. После запуска ПЦР, отредактируйте положение микропробирок в роторе (**Edit samples...**).

Номера строк в списке образцов соответствуют номерам ячеек амплификатора.

6. После завершения амплификации проведите анализ результатов по каждому каналу в отдельности (**Analysis** → **Quantitation** → **Cycling A. Yellow (Green)** → **Show**)
7. 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%
8. 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. рис. 2. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом Анализ результатов данной инструкции



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

Произведено: ООО “Фрактал Био”, 190020, г. Санкт-Петербург, ул.  
Бумажная, д. 17  
сайт: [fractalbio.com](http://fractalbio.com)  
E-mail: [info@fractalbio.com](mailto:info@fractalbio.com)  
Контактный телефон/факс: (812) 495-96-95