



Набор для выявления
РНК вируса болезни
Гамборо

(Вир-3-50/100, на 50/100 реакций)

Дата изменения: 15.04.2014

Содержание

| | |
|--|----|
| Компоненты набора | 4 |
| Область применения | 4 |
| Гарантия | 4 |
| Описание | 4 |
| Меры предосторожности | 5 |
| Важные замечания | 5 |
| Необходимое оборудование | 5 |
| Отбор материала | 6 |
| Выделение РНК | 6 |
| Подготовка материала | 7 |
| Необходимые контрольные образцы | 7 |
| Постановка обратной транскрипции | 7 |
| Постановка ПЦР | 8 |
| Анализ результатов | 9 |
| Контроль качества | 10 |
| Хранение и стабильность | 10 |
| Служба технической поддержки | 10 |
| Информация для заказов | 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 |
| 2X Микс Транскрипция | 550 | 1100 мкл |
| M-MLV обратная транскриптаза | 27 мкл | 55мкл |
| Положительный контрольный образец (КО+) | 180мкл | 360 мкл |

Область применения

Набор предназначен для выявления геномной РНК вируса болезни Гамборо, выделенной из биологических образцов и смывов, с помощью ПЦР в реальном времени. Чувствительность набора 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 трёх этапов: 1) постановка обратной транскрипции, 2) проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в реальном времени, 3) анализ результатов. Для детекции используется

канал **ROX** (аналоги Texas Red/Orange) макс. поглощения 580 нм, макс. флуоресценции 610 нм.

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

- При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку “RNase-free”, “DNase-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.

- Выделение РНК, приготовление смеси для обратной транскрипции необходимо проводить в ламинарном боксе.

- Приготовление реакционных смесей для ПЦР необходимо проводить в ПЦР-боксе.

- Использованный расходный материал должен сбрасываться в специальную ёмкость с дезинфицирующим раствором.

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:

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

Отбор материала

Для исследования используют РНК, выделенную из сыворотки крови, помета, соскобов с фабрициевой сумки и мышечной ткани. Материал для каждого животного 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 РНК

При выделении РНК не рекомендуется использовать наборы на основе силики или диатомовой земли. Наиболее подходящие варианты - наборы с микроцентрифужными колонками или на основе фенол-хлороформной экстракции. Мы рекомендуем использовать наборы для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала “ФБиоНуклео” (Фрактал Био). В основе набора лежит метод выделения НК на микроцентрифужных колонках, что позволяет выделять до 10 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.

Подготовка материала

Сыворотка крови

Не требуют специальной подготовки. На выделение используют 100 мкл.

Смывы

Если содержание материала в растворе высокое (раствор мутный, непрозрачный), то для выделения РНК достаточно 100 мкл пробы. Если содержание материала низкое (раствор прозрачный), то следует весь объём пробы центрифугировать 3 минуты при 13 000 об/мин. Затем осторожно удалить супернатант, оставив над осадком 100 мкл жидкости. Осадок в оставшейся жидкости использовать для выделения РНК.

Соскобы

Не требуют специальной подготовки, на выделение используют материал в объеме 1-2 спичечных головок.

Помет.

Из помета готовят 10% суспензию. Суспензию центрифугируют 5 минут при 13400 об/мин. На выделение используют 100 мкл надосадочной жидкости.

Необходимые контрольные образцы

Этап выделения РНК:

- Отрицательный контрольный образец (выделение РНК из воды)

Этап постановки обратной транскрипции:

- Отрицательный контрольный образец (вода или продукт выделения РНК из воды)

Этап постановки ПЦР:

- Отрицательный контрольный образец (вода или продукт обратной транскрипции с воды)
- Положительный контрольный образец **КО+** (входит в состав набора)

Постановка обратной транскрипции

1. Отберите необходимое количество микропробирок для постановки обратной транскрипции (1,5 мл).

2. В отдельной стерильной пробирке (1,5 мл) смешайте компоненты, входящие в набор, в указанных ниже пропорциях:

| Компонент | На одну реакцию (мкл) | На N реакций (мкл) |
|----------------------|-----------------------|--------------------|
| 2X Микс Транскрипция | 10 мкл | 10xN |
| M-MLV транскриптаза | 0,5 мкл | 0,5xN |

Перемешайте, осадите капли кратковременным центрифугированием

3. Перенесите по 10 мкл смеси в каждую микропробирку.

4. Добавьте по 10 мкл каждого образца в микропробирки со смесью.

5. Инкубируйте смесь в течение 30 мин. при +37°C.

Полученная кДНК может быть сразу же использована для постановки ПЦР. Храните синтезированную кДНК при -20 °С.

Постановка ПЦР

Отберите необходимое количество микропробирок для ПЦР с учётом контрольных образцов.

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

| Компонент | На 1 реакцию (мкл) | На N реакций (мкл) |
|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Микс ПЦР | 15 | 15xN |
| S-Тaq полимеразы | 0,5 | 0,5xN |

Важно! При добавлении S-Тaq полимеразы обязательно погружайте наконечник в раствор и пипетируйте для полного смывания фермента с наконечника пипетки. S-Тaq полимеразу следует убрать на -20°C сразу после добавления.

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 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 ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК проб.

Проверьте значения C_t контрольных образцов по каналу ROX:

- 1) C_t для отрицательного контрольного образца (КО-) должно быть >40 .
- 2) C_t для контрольного образца (КО+) должно быть < 35

При соответствии значений контрольных образцов, определите C_t исследуемых проб по каналу ROX и определите результат:

Геновая РНК вируса болезни Гамборо обнаружена, если для данной пробы определено значение порогового цикла C_t пробы < 35

Геномная РНК вируса болезни Гамборо не обнаружена, если для данной пробы не определено значение порогового цикла ($C_t >40$).

Внимание: C_t в районе 36-40 циклов является пограничным по чувствительности. В этом случае рекомендуется повторить анализ с этапа выделения РНК, взяв в несколько раз больше материала.

Контроль качества

Тестирование набора проводилось на вакцине, содержащей инактивированный вирус болезни Гамборо, в соответствии с протоколом, описанным выше. Выделение РНК проводилось с помощью набора “ФБиоНуклео” (Фрактал Био).

Хранение и стабильность

Набор может храниться до 12 месяцев без изменения качественных характеристик при температуре -20°C.

Транспортировку набора можно осуществлять всеми видами крытого транспорта. Допускается кратковременное хранение комплектов для постановки ПЦР и обратной транскрипции 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.

Информация для заказов

| Наименование | Кат.номер |
|---|---------------|
| Набор для выявления РНК вируса болезни Гамборо (на 50/100 реакций) | Вир-3-50/100 |
| Набор для выявления РНК вируса болезни Гамборо, в полной комплектации (на 50/100 реакций) | Вир-3К-50/100 |
| Набор «ФБиоНуклео» для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала (на 4/50 выделения) | НК-1-4/50 |

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
- Флуорофор – ROX
- 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 каналу ROX |
|-------------------|-------------|---------|-----------------------------------|
| 1 | 95 °С | 180 сек | нет |
| 40 | 60 °С | 30 сек | да |
| | 95 °С | 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.

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 |
|--|-------------|---------|--------------------------------|
| Hold | 95 °C | 180 сек | |
| Cycling This cycle repeats 40 times | 60 °C | 30 сек | Acquiring to Cycle A on Orange |
| | 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 1st acquisition**):

Для канала Orange установите параметры Min Reading – 5Fl и Max Reading 10Fl

4. В окне Summery 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 (**Analysis → Quantitation → Cycling A. Orange → 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. 1.
- Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом Анализ результатов данной инструкции.

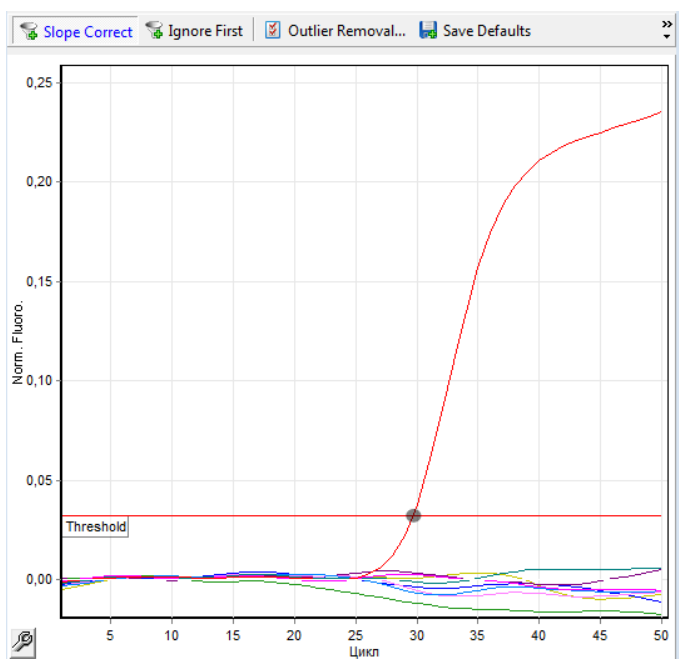


Рис. 1. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для КО+.

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