



Набор реагентов для
выявления вируса
болезни Марека

(Вир-5-50/100, на 50/100 реакций)

Дата изменения: 21.05.2014

Содержание

Компоненты набора	4
Область применения	4
Гарантия	4
Описание	4
Необходимое оборудование	5
Меры предосторожности	5
Важные замечания	6
Необходимые контрольные образцы	6
Выделение ДНК	7
Постановка ПЦР	7
Анализ результатов	8
Контроль качества	9
Хранение и стабильность	9
Служба технической поддержки	9
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
Положительный контрольный образец (КО+)	180мкл	360 мкл

Область применения

Набор предназначен для выявления геномной ДНК вируса болезни Марека, 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.

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 реальном времени, 2) анализ результатов. Для детекции используется канал **ROX** (аналоги

Texas Red/Orange) макс. поглощения 580 нм, макс. флуоресценции 610 нм.

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
- Микроцентрифуга
- 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

- При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку “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.
- Приготовление реакционных смесей для ПЦР необходимо проводить в ПЦР-боксе.
- Использованный расходный материал должен сбрасываться в специальную ёмкость с дезинфицирующим раствором.

Отбор материала

Для исследования используют ДНК, выделенную из крови, соскобов с внутренних органов и мышечной ткани. Материал от каждой птицы отбирается отдельными инструментами в отдельные стерильные ёмкости. Кровь отбирается в пробирки с EDTA. Материал следует хранить не более 10 суток при температуре 2-8 °С, более длительное хранение при температуре не выше -16 °С.

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)

Выделение ДНК

Выделение ДНК из образцов клинического 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.

Кровь.

Не требуют специальной подготовки. На выделение используют 50 мкл.

Соскобы.

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

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

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 убирать 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 ДНК вируса болезни Марека.

Проверьте значения Ct контрольных образцов по каналу ROX:

1) C_t для отрицательного контрольного образца (КО-) должно отсутствовать (>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:

Геномная ДНК вируса болезни Марека обнаружена, если для данной пробы определено значение порогового цикла C_t пробы < 35

Геномная ДНК вируса болезни Марека 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 ДНК, взяв в несколько раз больше материала.

Контроль качества

Тестирование набора проводилось на плазмиде, содержащей отрезок ДНК вируса болезни Марека, в соответствии с протоколом, описанным выше.

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, соблюдая температуру хранения набора (-20°C)

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 вируса болезни Марека (на 50/100 реакций)	Вир-5-50/100
Набор для выявления вируса болезни Марека, в полной комплектации (на 50/100 реакций)	Вир-5к-50/100
Набор «ФБиоНуклео» для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала (на 50 выделений)	НК-1-50

Дополнение 1

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

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 по каналу ROX
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.

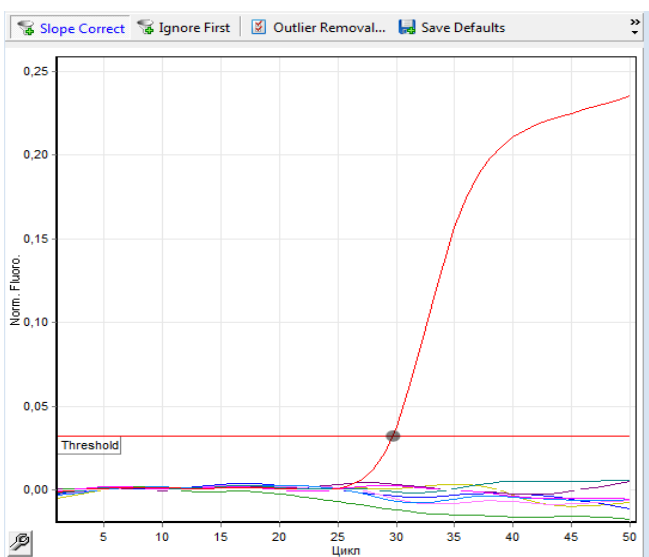


Рис. 1. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для КО+

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
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 Summary 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 **KO+**. См. рис. 1. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом Анализ результатов данной инструкции.

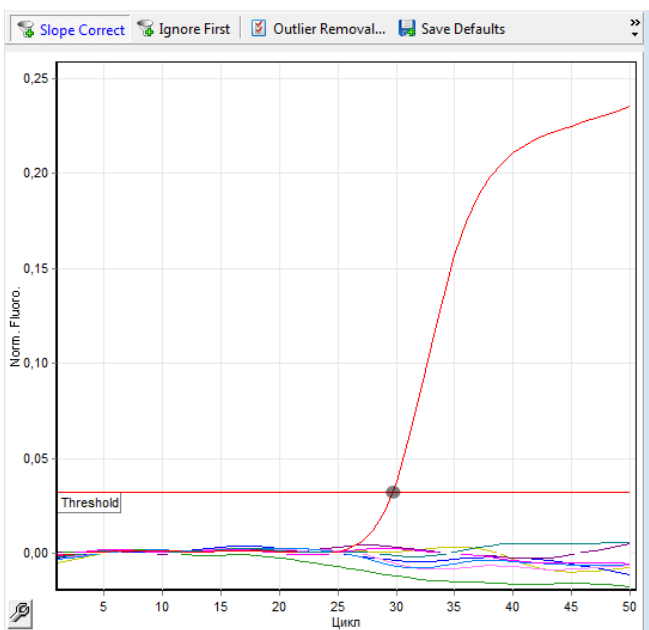


Рис. 1. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для **KO+**

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