

Набор для выявления РНК вируса блютанга



Артикул: Вир-30-50/100 (на 50/100 реакций)

Компоненты набора

Компоненты	Количество реакций	
	50 реакций	100 реакций
Микс ОТ-ПЦР	750 мкл	1500 мкл
Смесь ферментов	27 мкл	55 мкл
Положительный контрольный образец (КО+)	180 мкл	360 мкл

Область применения

Набор предназначен для выявления РНК вируса блютанга (*Bluetongue virus*), выделенной из биологических образцов, 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 качества и дизайна.

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

Описание

Процедура анализа состоит из двух этапов: 1) постановка обратной транскрипции (далее – ОТ) и 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 кДНК вируса Блютанга; макс. поглощения 530 нм, макс. флуоресценции 570 нм.
2. Канал **FAM** (аналоги: **Sybr Green/Green**): для детекции внутреннего контроля (геномная ДНК млекопитающих); 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

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 ОТ и ПЦР:

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

Отбор материала

Для исследования используют тотальный пул нуклеиновых кислот, выделенных из плазмы крови, сыворотки крови или патологического материала животного (лимфатические узлы, селезенка). Материал от каждого животного отбирается отдельными инструментами в отдельные стерильные емкости. Кровь отбирается в отдельные пробирки. Материал следует хранить не более 10 суток при температуре 2-8°C, более длительное хранение при температуре не выше -16°C.

Необходимое количество на выделение плазмы и сыворотки крови – 1 мл. Материал необходимо центрифугировать 5 мин. при скорости 5000 об/мин. Слить надосадочную жидкость оставив примерно 100 мкл. Ресуспензировать осадок, на выделение брать 100 мкл.

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 животного.

Постановка обратной транскрипции и ПЦР

Отберите необходимое количество микропробирок для ПЦР с учетом контрольных образцов.

1. В отдельной стерильной пробирке (1,5 мл) смешайте входящие в набор Микс ОТ-ПЦР и Смесь ферментов, в указанных ниже пропорциях:

Компонент	На 1 реакцию, мкл	На N реакций, мкл
Микс ОТ-ПЦР	15	15xN
Смесь ферментов	0,5	0,5xN

Важно! При добавлении ферментов обязательно погружайте наконечник в раствор и пипетируйте для полного их смывания с наконечника пипетки. Смесь ферментов 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
37°C	900	1
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 кДНК вируса.

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+	<35	<35

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

Таблица 2. Определение результата исследуемой пробы по значениям Ct.

Канал FAM	Канал R6G	Результат
<35	<35	РНК вируса обнаружена
<35	нет	РНК вируса не обнаружена

Важно! Если для исследуемой пробы по каналу FAM Ct >35 и по каналу R6G Ct >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, взяв в несколько раз больше биоматериала.

Хранение и стабильность

Срок годности: 12 месяцев.

Температурный режим хранения компонентов набора.

1. Наборы реагентов для ОТ и ПЦР – при -20°C.
2. Транспортировку набора можно осуществлять всеми видами крытого транспорта. Допускается кратковременное хранение при 2-15°C не более 7 суток.

Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Служба технической поддержки

В случае появления вопросов обращайтесь в службу тех. поддержки: info@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 обратной транскрипции и 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).

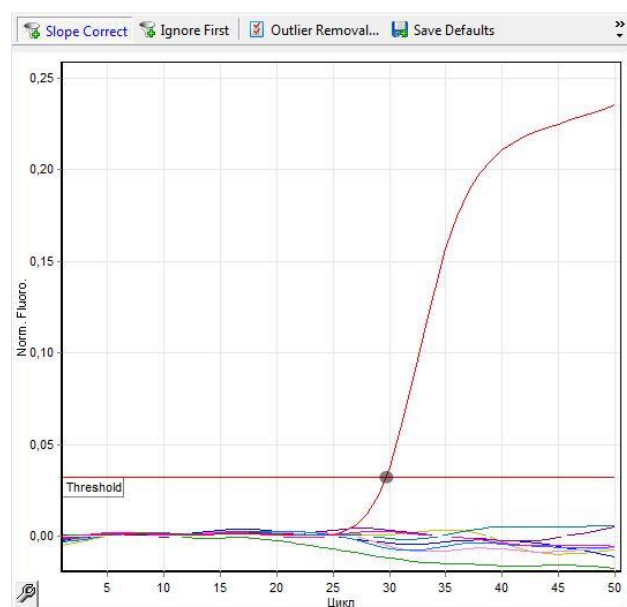
Важно! Выбранные параметры должны соответствовать калибровочным!

 - 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 Summary**.
4. Создайте новый температурный протокол (**Workshop** → **Setup** → **Protocol** → **Selected protocol** → **Create new**) согласно таблице ниже.

Кол-во циклов	Температура	Время	Детекция
1	37°C	15 мин	–
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 2

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

Выполняйте пункты 1-7 раздела «Постановка обратной транскрипции и 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	37°C	15 мин	–
Hold	95°C	180 сек	–
Cycling This cycle repeats 40 times	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 Green установите параметры Min Reading – 15Fl и Max Reading 20Fl;
 - для канала Yellow установите параметры Min Reading – 5Fl и Max Reading 10Fl.
5. В окне **Summary** 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
9. По каждому каналу в отдельности (**Analysis** → **Quantitation** → **Cycling A. Yellow (Green)** → **Show**)
10. 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%.
11. 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.
12. Продолжайте анализ результатов в соответствии с разделом «Анализ результатов» данной инструкции.

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

