Набор для выявления ДНК вируса африканской чумы свиней в формате direct real time

(Вир-21drt-50/100, на 50/100 реакций)

Дата изменения: 26.01.2021

Содержание

Компоненты набора 4
Область применения 4
Гарантия 4
Описание 4
Необходимое оборудование 5
Важные замечания 5
Меры предосторожности 6
Отбор и подготовка материала 6
Необходимые контрольные образцы 7
Постановка ПЦР 7
Анализ результатов 8
Хранение и стабильность 9
Служба технической поддержки 9

Компоненты набора

Компоненты	Количество	
	50 реакций	100 реакций
Микс ПЦР	750 мкл	1500 мкл
S-Taq полимераза	55 мкл	110 мкл
Положительный контрольный образец (КО+)	180 мкл	360 мкл
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	600 мкл	1200 мкл

Область применения

Набор предназначен для выявления геномной ДНК вируса африканской чумы свиней (АЧС, *African swine fever virus*), в биологических образцах, в продуктах свиноводства и пищевых изделиях, содержащих или потенциально содержащих компоненты свиного происхождения, с помощью ПЦР в реальном времени. **Применение набора не требует этапа выделения нуклеиновых кислот.** 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) отбор проб и их подготовка к анализу; 2) проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией

в реальном времени, 3) 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 вируса АЧС.
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:

- Амплификатор для ПЦР в реальном времени
- Микроценрифуга/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

Важные замечания

- Приготовление реакционных смесей для ПЦР необходимо проводить в ПЦР-боксе.
- 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.
- Использованный расходный материал должен сбрасываться в специальную ёмкость с дезинфицирующим раствором.

Меры предосторожности

При работе с набором 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.

Отбор и подготовка материала

Сыворотка крови

Для получения сыворотки кровь отбирают в пробирки с активатором свёртывания.

Кровь

От каждого животного отбирается в отдельные вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт (K_2EDTA или K_3EDTA). Кровь является допустимым, но не лучшим материалом для исследования, ввиду большого количества белка. Предпочтительнее использовать сыворотку крови или суспензии тканей.

Патологический материал, продукты питания, полуфабрикаты

Для исследования используют: лимфатические узлы, селезёнка, лёгкие, костный мозг, свиной шпик, сало, фарш, колбасные изделия, пельмени, студень и др. Материал от каждого животного или образца продуктов питания отбирается отдельными инструментами в отдельные стерильные ёмкости.

Из отобранного материала готовят гомогенизат с применением оборудования для гомогенизации или 5% суспензию. Количество

приготовляемого гомогената определяется оборудованием и расходными материалами. Для исследования потребуется лишь 2 мкл. Для приготовления суспензии берут соскобы с поверхности тканей или продуктов в объеме 1-2 спичечных головки и ресуспензируют в 500 мкл дистиллированной воды. Суспензию также можно приготовить, взяв соскоб с поверхности с помощью зонда типа А или цитощетки типа Д и поместив их в 500 мкл дистиллированной воды.

Культура клеток

Не требует дополнительной подготовки.

Материал следует хранить не более 10 суток при температуре 2-8 °С, более длительное хранение при температуре не выше -16 °С.

Необходимые контрольные образцы

- Отрицательный контрольный образец (входит в состав набора).
- Положительный контрольный образец (входит в состав набора).

Постановка ПЦР

Подготовку ПЦР смеси и внесение проб в амплификационные пробирки рекомендуется проводить в зоне выделения НК, для сохранение направления движения материалов.

1. Отберите необходимое количество микропробирок для ПЦР с учётом контрольных образцов.

2. 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	1	N

Важно! При добавлении S-Taq полимеразы обязательно погружайте наконечник в раствор и пипетируйте для полного смывания фермента с наконечника пипетки.

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 исследуемые образцы на дно пробирки, опустив наконечник до дна пробирки, в следующих количествах:
сыворотка крови - 10 мкл;
суспензия (перед внесением перемешать) - 10 мкл;
гомогенизат - 2 мкл + 8 мкл ОКО из набора.
цельная кровь - 2 мкл + 8 мкл ОКО из набора
После внесения не перемешивать и не пипетировать!
5. Внесите в первую микропробирку с ПЦР смесью 10 мкл отрицательного контрольного образца (КО-).
6. В последнюю микропробирку добавьте 2 мкл любой из анализируемых проб и 8 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	

Анализ результатов

По каналу R6G регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК вируса.
По каналу FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации внутреннего контроля.
По таблице 1 проверьте значения Ct контрольных образцов.

	Канал **FAM**	Канал **R6G**
ОКО	> 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
≤37	≤ 33	**ДНК вируса обнаружена**
≤37	> 40	**ДНК вируса не обнаружена**
>40	40 > C_t > 33	**Повторить анализ. При воспроизведении результата считать - ДНК вируса обнаружена**
40>C_t > 37	>40	**Если материал не сыворотка, то повторить анализ подготовив пробу заново. Если сыворотка, то считать - ДНК вируса не обнаружена**
>40	>40	**Повторить анализ подготовив пробу заново.**

Таблица 2. Определение результата исследуемой пробы по значениям Ct.

Хранение и стабильность

Срок годности 12 месяцев.
Температурный режим хранения набора:
Набор для постановки ПЦР – при +2-+8 °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.

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