



**Набор реагентов для
выявления ДНК тканей
жвачных животных**

(ТК-1-50/100, на 50/100 реакций)

Дата изменения 19.06.2014

Содержание

Компоненты набора	3
Область применения	3
Гарантия	3
Описание	3
Необходимое оборудование	4
Меры предосторожности	4
Важные замечания	5
Выделение ДНК	5
Необходимые контрольные образцы	5
Постановка ПЦР	6
Анализ результатов	7
Проблемы и рекомендации	8
Хранение и стабильность	9
Служба технической поддержки	9
Информация для заказов	9
Дополнение 1	10
Дополнение 2	12

Компоненты набора

Компоненты	количество	
	50 реакций	100 реакций
Микс ПЦР	750 мкл	1500 мкл
S-Taq полимераза	27 мкл	55 мкл
Внутренний контрольный образец (ВКО)	500 мкл	1000 мкл
Положительный контрольный образец (КО+)	180 мкл	360 мкл

Область применения

Набор предназначен для выявления ДНК тканей жвачных животных: говядины и баранины с помощью анализа ПЦР в реальном времени. Чувствительность набора до 0,2% ткани 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 и анализа результатов используются три 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 говядины
- 2) Канал **ROX** (аналог – **Texas red**): макс. поглощения 585 нм, макс. флуоресценции 630 нм; детекция ДНК баранины;
- 3) Канал **FAM** (аналог - **Sybr Green**): макс. поглощения 495 нм, макс. флуоресценции 520 нм; детекция внутреннего контроля

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.
- **Обязательно перед выделением ДНК добавить к пробам внутренний контрольный образец** (см. Выделение ДНК)
- Использованный расходный материал должен сбрасываться в специальную ёмкость с дезинфицирующим раствором.

Выделение ДНК

Выделение ДНК из образцов может проводиться различными методами, например, с помощью наборов на основе силики, наборов с микроцентрифужными колонками, наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п.

Начиная с этапа выделения ДНК необходимо проводить **внутренний контроль**. Для этого добавьте к исследуемой пробе 10 мкл внутреннего контрольного образца (**ВКО**) и выделяйте ДНК в соответствии с используемым протоколом. Перед использованием внутренний контроль необходимо тщательно ресуспендировать на вортексе.

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 (входит в состав набора)

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-Taq полимеразу, в указанных ниже пропорциях:

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

Важно! При добавлении S-Taq полимеразы обязательно погружайте наконечник в раствор и пипетируйте для полного смывания фермента. S-Taq 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 **R6G** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК говядины.

По каналу **ROX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК баранины.

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

Проверьте значения пороговых циклов (C_t) контрольных образцов по таблице 1.

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

Таблица 1. Значения C_t для контрольных образцов.

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

Если хоть одно значение контрольных образцов не выполняется, обратитесь к разделу Проблемы и рекомендации.

Таблица 2. Определение результата исследуемой пробы по значениям C_t .

Канал FAM	Канал R6G	Канал ROX	Результат
< 35	>40	>40	ДНК говядины и ДНК баранины не обнаружены
Любое значение	< 31	>40	ДНК говядины обнаружена, ДНК баранины отсутствует
Любое значение	>40	< 31	ДНК баранины обнаружена, ДНК говядины отсутствует
Любое значение	< 31	< 31	Обнаружены ДНК говядины и ДНК баранины

Проблемы и рекомендации

C_t для положительного контрольного образца > 35	Убедитесь, что не вышел срок годности. Обратитесь к производителю
C_t для отрицательного контрольного образца <40	Контаминация. Проведите мероприятия по очистке оборудования и помещения от контаминантов. Смените реактивы. Возможно, установлены некорректные параметры для расчёта.
C_t для исследуемой пробы по любому из каналов в районе 35 – 40	Маленькое количество ДНК. Проведите выделение ДНК заново, увеличив количество материала.

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 реагентов для выявления ДНК тканей жвачных животных (на 50/100 реакций)	ТК-1-50/100
Набор реагентов для выявления ДНК тканей курицы и свинины (на 50/100 реакций)	ТК-2-50/100
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)

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, 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 FAM, HEX, ROX
1	95 °C	180 сек	нет
40	60 °C	30 сек	да
	95 °C	20 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

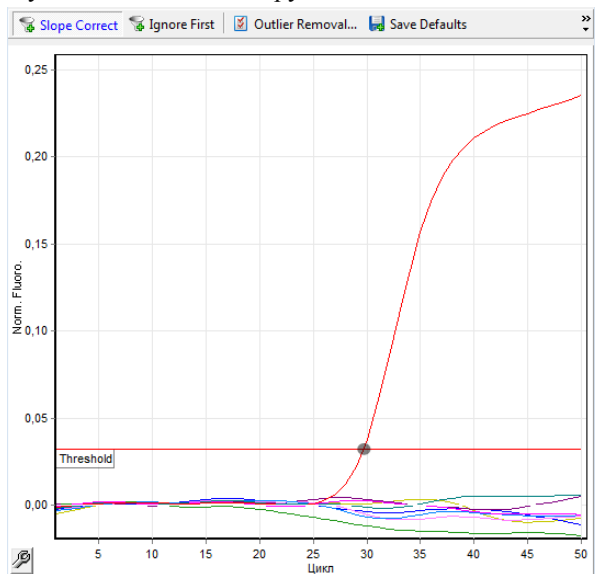


Рис. 1. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для КО+

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
Hold	95 °C	180 сек	
Cycling This cycle repeats 40 times	60 °C	30 сек	Acquiring to Cycle A on Green, Yellow, Orange
	95 °C	20 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 Green установите параметры Min Reading – 15Fl и Max Reading 20Fl

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

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 (**Analysis** → **Quantitation** → **Cycling A. Green (Yellow/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%
 - 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

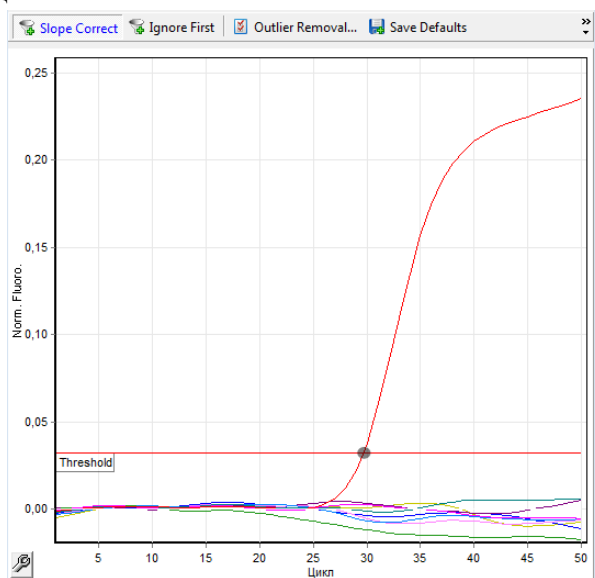


Рис. 2. Выставление пороговой линии на начале линейного участка для КО+.

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

