Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, д. 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91
E-mail: sales@biolabmix.ru

Тест-система для определения присутствия ДНК бактерии рода *Salmonella* методом ПЦР в режиме реального времени

Кат. номер PDSPF-SalSpp-100

Назначение

Тест-система предназначена для выявления присутствия ДНК микроорганизмов рода *Salmonella (SalSpp)* в биологическом образце методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с помощью флуоресцентного зонда. Набор рассчитан на проведение 100 анализов в объёме 25 мкл на одну реакцию.

Описание

Бактерии рода Salmonella относятся к семейству Enterobacteriaceae. Вызывают острую кишечную инфекцию животных и человека.

Данная система способна определять фрагмент ДНК (GeneBank CP075010.1, CP074335.1, OZ184554.1, CP029035.1, CP117371.1, CP102756.1, CP029918.1, CP173312.1, AP024352.1, CP140737.2., CP009561.1, CP019176.1, CP130118.1, CP025449.1, OZ261657.1, CP117392.1, LT904885.1, LT904852.1, LT905060.2, OX442412.1, OZ184553.1, CP130115.1, CP075011.1, CP101348.1, CP120392.1, CP029999.1, OL581602.1, AP040266.1, LR134137.1, FR877557.1 CP053416.1, и т.д.) *Salmonella (SalSpp)* в выделенной суммарной ДНК из образцов тканей, клеточных линий и культуральной среды с высокой специфичностью и чувствительностью. Чувствительность системы позволяет определить присутствие фрагмента ДНК *Salmonella (SalSpp)* в суммарной ДНК от 0,1 нг на реакцию.

Методика исследования

Метод обнаружения ДНК *Salmonella (SalSpp)* основан на амплификации специфического участка ДНК за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента *Taq*-полимеразы.

Материал исследования

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из биологического образца одним из коммерчески доступных наборов.

Состав набора

	100 анализов в объёме 25 мкл
2× буфер HS-qPCR UDG	1× 1,5 мл
20× смесь праймеров SalSpp	1 × 135 мкл
Положительный контроль (SalSpp)	1 × 100 мкл
Отрицательный контроль (SalSpp)	1 × 100 мкл
Внутренний контрольный образец (ВКО)	1 × 500 мкл
Стерильная вода	1 × 1,5 мл

Проведение исследования

Стадия выделения ДНК

ВАЖНО! На стадии выделения ДНК из биологических образцов добавьте к каждому выделяемому образцу по 5 мкл Внутреннего контрольного образца (ВКО).

А) Подготовка проб для проведения ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК– до 9 мкл.

1. Разморозить необходимые растворы для проведения анализа. После размораживания компонентов набора и образцов перемешать смеси и сбросить капли со стенок на микроцентрифуге.

2. В отдельной пробирке приготовить реакционные смеси объемом для необходимого количества образцов (N+1, где N – количество исследуемых образцов с учетом всех контролей).

Состав реакционной смеси на 1 пробирку:

Компонент	Объем
2× буфер HS-qPCR UDG	12,5 мкл
20× смесь праймеров salSpp	1,25 мкл
Матрица	1 – 9 мкл
Стерильная вода	до 25 мкл

В качестве ДНК-матрицы может быть использована, как выделенная ДНК, так и культуральная среда. При использовании среды для анализа рекомендованный объем 5-9 мкл. Мы рекомендуем использовать выделенную и очищенную ДНК – это повышает чувствительность метода. Положительный контрольный образец (ПКО) идет в объеме 1 мкл.

Контроли этапа ПЦР:

а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – стерильная вода;

б) положительный контроль ПЦР (К+) – позитивный контрольный образец (SalSpp)

3. Поместить тонкостенные пробирки на штатив «рабочее место», добавить отдельным наконечником необходимый объем реакционной смеси в каждую. Промаркировать пробирки.

ВАЖНО! При использовании приборов для амплификации с вертикальным съемом детекции оптического сигнала (например, QuantStudio 5, Applied Biosystems; iCycler iQ5, Bio-Rad и др.) запрещено проводить маркировку на крышке пробирок.

4. Добавить отдельными наконечниками в пробирки с готовой реакционной смесью тестовые и контрольные образцы.

5. Осторожно перемешать без образования пузырей и сбросить капли, используя центрифугу (при этом необходимо использовать специальный ротор для используемого пластика).

Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

1. Включить амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить программу.
2. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки реакционного модуля прибора (лунки пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе)
3. Запрограммировать прибор для выполнения программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала следуя алгоритму программного обеспечения.

Использовать каналы с длиной волны света (возбуждение / детекция)

- 533 нм / 549 нм – жёлто-зелёный спектр (HEX, SIMA, R6G)
- 565–585 нм / 605–650 нм –оранжевый спектр (ROX)

Задать следующие параметры эксперимента:

Шаг	Температура °C	Время инкубации	Количество циклов	Измерение флуоресценции
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	1	-
Предварительная денатурация	95	5 мин	1	-
Денатурация	95	5 сек	45	-
Отжиг/Детекция	60	40 сек		HEX,ROX

Внимание! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе.

В) Интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:
- по каналу для флуорофора HEX (R6G, SIMA) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Salmonella (SalSpp)*;
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК Внутреннего контрольного образца (ВКО).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов. Результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения Ct или Cq), сомнительным во всех других случаях.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций.

Таблица оценки результатов контрольных реакций

Контроль	Контролируемый этап	Значение граничного порогового цикла Ct по каналу HEX	Значение граничного порогового цикла Ct по каналу ROX
К-	ПЦР	Отсутствует или >38	Отсутствует или >38
К+	ПЦР	≤ 29	≤ 32
ВКО+	Выделение	Отсутствует или >38	≤ 32
ВКО-	Выделение	Отсутствует или >38	Отсутствует или >38

Внимание!

1. Если для отрицательного контроля выделения ВКО- и положительного контроля выделения ВКО+ по каналу HEX получено значение Ct <38, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Salmonella (SalSpp)*, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если для отрицательного контроля выделения ВКО- по каналам ROX получено значение Ct <38, необходимо повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Если для отрицательного контроля ПЦР К- по каналам HEX и ROX получено значение Ct <38, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Salmonella (SalSpp)*, начиная с этапа ПЦР.
4. Если для положительного контроля К+ по каналам HEX и ROX получено значение Ct >29, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Salmonella (SalSpp)*, начиная с этапа ПЦР.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света: при +4 °С – 3 недели; при -20 °С – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами. Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.