



Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

Набор для определения *Ralstonia solanacearum*

Кат. номер TFD011

Назначение

Набор предназначен для проведения амплификации специфического участка генома патогена в образцах выделенной ДНК из фитоматериала в режиме реального времени с использованием флуоресцентных зондов.

Состав набора

Реагент	Количество
БиоМастер UDG HS-qPCR (2×)	1 × 1,25 мл
Набор праймеров RALSSL	1 × 165 мкл
Стерильная вода	1 × 1,25 мл
Позитивный контрольный образец RALSSL	1 × 100 мкл
Внутренний контрольный образец ДНК	1 × 550 мкл

Набор рассчитан на проведение 100 анализов в объеме 25 мкл на одну реакцию.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Протокол постановки ПЦР

В качестве матрицы для проведения реакции используется очищенная ДНК из образцов.

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл.

- Разморозить пробирки с реагентами БиоМастер UDG HS-qPCR, Стерильную воду, Набор праймеров RALSSL и Позитивный контрольный образец RALSSL – каждую пробирку тщательно перемешать на вортексе.
- Осадить капли жидкости со стенок и крышек пробирок, кратковременно открутив их на микроцентрифуге.
- В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь объемом для необходимого количества образцов (N+1, где N – количество исследуемых образцов с учетом всех контролей).

Контроли этапа ПЦР:

- отрицательный контроль ПЦР (К–) – стерильная вода;
- положительный контроль ПЦР (К+) – позитивный контрольный образец RALSSL

Состав реакционной смеси на 1 пробирку:

Компонент	Объем
БиоМастер UDG HS-qPCR	12,5 мкл
Набор праймеров RALSSL	1,5 мкл
Стерильная вода	6 мкл

4. Поместить тонкостенные пробирки на штатив «рабочее место», добавить отдельным наконечником 20 мкл 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.

5. Добавить отдельными наконечниками в пробирки с готовой реакционной смесью по 5 мкл образца, в пробирки для контролей по 5 мкл соответствующих контролей.

6. Осторожно перемешать без образования пузырей и сбросить капли, используя вортекс или центрифугу (при этом необходимо использовать специальный ротор для микропробирок).

Б. 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)

- 470 \pm 15 нм / 520 \pm 15 нм
- 580 \pm 10 нм / 623 \pm 14 нм

Задать следующие параметры эксперимента:

Протокол амплификации

Шаг	Температура α , °C	Время инкубации	Количество циклов
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	10 сек	45
Отжиг/Детекция	60	30 сек	

* – смотрите Приложение 1 Таблица соотношения каналов и красителей

Таблица соотношения каналов и красителей

Возбуждение	Детекция	Красители
470 \pm 15	520 \pm 15	FAM, SYBR Green, Fluorescein, EvaGreen, AlexaFluor 488
520 \pm 10	558 \pm 11	JOE, VIC, HEX, TET, Yakima Yellow, CAL Fluor Gold 540
580 \pm 10	623 \pm 14	ROX, Cy3.5, CAL Fluor Red 610, Texas Red, Alexa Fluor 568
640 \pm 10	682 \pm 14	Cy5, Quasar 670, Alexa Fluor 633
662 \pm 10	711 \pm 12	Quasar 705, Alexa Fluor 680

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 FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Ralstonia solanacearum*,
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК 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. Тест считается успешным, если эффективно и корректно прошли обе стадии: выделения ДНК и ПЦР.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- образец считается **положительным** по содержанию ДНК *Ralstonia solanacearum*, если на канале FAM получено значение порогового цикла Ct, не превышающее граничное значение - 38.
- образец считается **отрицательным** по содержанию ДНК *Ralstonia solanacearum*, если на канале FAM отсутствует значение Ct или получено значение Ct более 38, а по каналу ROX не более 38.
- образец считается **сомнительным** в случае получения сомнительного результата по любому из каналов. Рекомендуется повторное исследование соответствующего образца.

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	
		FAM	ROX
ОКО	Экстракция ДНК	нет	≤ 38
К-	ПЦР	нет	нет
К+	ПЦР	≤ 38	нет

Эффективность стадии выделения оценивается для каждой пробы индивидуально по присутствию в ячейке сигнала по каналу ROX. Если сигнал в канале ROX отсутствует или превышает значение Ct более 38, следовательно, выделение прошло неудачно, и тестирование образца необходимо повторить, начиная со стадии выделения.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (К+) по каналу FAM значение Ct отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить ПЦР-

исследование для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Ralstonia solanacearum*, начиная с этапа экстракции ДНК.

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОКО) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу FAM получено значение Ct, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Ralstonia solanacearum*, начиная с этапа экстракции ДНК.

Условия хранения

Набор для постановки ПЦР хранить в месте, защищенном от попадания света: при +25 °С – 7 дней; при +4 °С – 4 месяца; при -20°С – 18 месяцев. Допускается не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Набор для постановки ПЦР перевозить при температуре 0 - +4 °С.