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 вида *Citrobacter rodentium (Citro)* методом ПЦР в режиме реального времени

Кат. номер PDSPF-Citro-100

Назначение

Тест-система предназначена для выявления присутствия ДНК микроорганизмов вида *Citrobacter rodentium (Citro)* 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 вида *Citrobacter rodentium относятся к* семейству Enterobacteriaceae, род Citrobacter. Бактерия представляет собой грамотрицательную факультативно-анаэробную палочку. Вызывает инфекции желудочно-кишечного тракта у лабораторных мышей и крыс. Выступает основной моделью для изучения кишечных патогенов человека и механизмов иммунитета.

Данная система способна определять фрагмент ДНК (GeneBank CP038008.1, CP082833.1, AY726731.1, FN543502.1, и т.д.) *Citrobacter rodentium (Citro)* в выделенной суммарной ДНК из образцов тканей, клеточных линий и культуральной среды с высокой специфичностью и чувствительностью. Чувствительность системы позволяет определить присутствие фрагмента ДНК *Citrobacter rodentium (Citro)* в суммарной ДНК от 0,1 нг на реакцию.

Методика исследования

Метод обнаружения ДНК *Citrobacter rodentium (Citro)* 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 Citro	1 × 135 мкл
Положительный контроль (Citro)	1 × 100 мкл
Отрицательный контроль (citro)	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 Citro	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 (Citro)

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 *Citrobacter rodentium (Citro)*;

- 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 *Citrobacter rodentium (Citro)*, 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 *Citrobacter rodentium (Citro)*, 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 *Citrobacter rodentium (Citro)*, 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.