



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 Вируса огуречной мозаики (CMV)

Кат. номер TFR002

Назначение

Набор предназначен для проведения реакции обратной транскрипции выделенной РНК с последующей амплификацией участка полученной кДНК в режиме реального времени с флуоресцентными зондами одношаговым методом.

Состав набора

| Реагент | Количество |
|--------------------------------------|-------------|
| Смесь для ОТ-ПЦР-РВ (2×) | 1 × 1,25 мл |
| БиоМастер-микс (25×) | 1 × 100 мкл |
| Набор праймеров CMV | 1 × 165 мкл |
| Стерильная вода | 1 × 1,25 мл |
| Позитивный контрольный образец (CMV) | 1 × 100 мкл |
| Внутренний контрольный образец РНК | 1 × 550 мкл |

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

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Протокол постановки ОТ-ПЦР

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

А. Подготовка проб для проведения ОТ-ПЦР

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

1. Разморозить пробирки с реагентами БиоМастер-микс, Смесь для ОТ-ПЦР-РВ, Стерильную воду, Набор праймеров CMV и Позитивный контрольный образец – каждую пробирку тщательно перемешать на вортексе.
2. Осадить капли жидкости со стенок и крышек пробирок, кратковременно открутив их на микроцентрифуге.
3. 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:

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

Состав реакционной смеси на 1 пробирку:

| Компонент | Объем |
|--------------------------|----------|
| Смесь для ОТ-ПЦР-РВ (2×) | 12,5 мкл |
| БиоМастер-микс (25×) | 1 мкл |
| Набор праймеров CMV | 1,5 мкл |
| Стерильная вода | 5 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 центрифугу (при этом необходимо использовать специальный ротор для микропробирок).

Б. Проведение ОТ-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+15 нм / 520+15 нм
- 580+10 нм / 623+14 нм

Задать следующие параметры эксперимента:

Протокол амплификации

| Шаг | Температура, °C | Время инкубации | Количество циклов |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Обратная транскрипция | 45 | 15 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+15 | 520+15 | FAM, SYBR Green, Fluorescein, EvaGreen, AlexaFluor 488 |
| 520+10 | 558+11 | JOE, VIC, HEX, TET, Yakima Yellow, CAL Fluor Gold 540 |
| 580+10 | 623+14 | ROX, Cy3.5, CAL Fluor Red 610, Texas Red, Alexa Fluor 568 |
| 640+10 | 682+14 | Cy5, Quasar 670, Alexa Fluor 633 |
| 662+10 | 711+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 кДНК CMV,
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК 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 РНК и ОТ-ПЦР.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- образец считается **положительным** по содержанию РНК CMV, если на канале FAM получено значение порогового цикла Ct, не превышающее граничное значение - 38.
- образец считается **отрицательным** по содержанию РНК CMV, 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 ОТ-ПЦР (К+) по каналу FAM значение Ct отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена РНК CMV, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОКО) и/или отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналу FAM получено значение Ct, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК CMV, начиная с этапа экстракции РНК.

Условия хранения

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

Условия транспортировки

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