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 пятнистого увядания томатов (TSWV)

Кат. номер TFR007

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 TSWV	1 × 165 мкл
Стерильная вода	1 × 1,25 мл
Позитивный контрольный образец (TSWV)	1 × 100 мкл
Внутренний контрольный образец РНК	1 × 550 мкл

Набор рассчитан на проведение 100 анализов в объёме 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 TSWV 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 TSWV

Состав реакционной смеси на 1 пробирку:

Компонент	Объем
Смесь для ОТ-ПЦР-РВ (2×)	12,5 мкл
БиоМастер-микс (25×)	1 мкл
Набор праймеров TSWV	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, °С	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 TSWV,
- 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 TSWV, если на канале FAM получено значение порогового цикла Ct, не превышающее граничное значение - 38.

– образец считается **отрицательным** по содержанию РНК TSWV, 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 TSWV, 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 TSWV, 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.