



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

Тест-система для определения ДНК *Salmonella spp.*

Кат. № PDF-SalSp-26

Назначение

Тест-система предназначена для обнаружения ДНК *Salmonella spp.* в биологическом образце методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с помощью флуоресцентного зонда.

Описание

Salmonella – род факультативно анаэробных бактерий. Вызывают острую кишечную инфекцию животных и человека.

Методика исследования

Метод обнаружения ДНК *Salmonella spp.* основан на амплификации специфического участка ДНК (выравнивание более чем из 100 последовательностей, в том числе 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) за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных праймеров и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы.

Материал исследования

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из биологического образца с использованием литического буфера, входящего в состав набора.

Состав набора

Реагент	96 анализов
Стерильная вода	2×1,5 мл
Позитивный контрольный образец (SalSp)	1×250 мкл*
Литический буфер	1×12 мл
Протеиназа К	1× 60 мкл*
Планшет с реакционной смесью	1 шт
Планшет для постановки литической реакции (прозрачный)	1 шт
Крышки для планшета	12 шт
Пленка для ПЦР-планшета	1 шт

* – указан объем воды, необходимый для ресуспендирования лиофилизированных реагентов

Проведение исследования

Предподготовка

1. Если набор используется первый раз необходимо ресуспендировать (перевести из лиофилизированного состояния в жидкое) лиофилизированные реагенты. Для этого добавить воду в каждую пробирку с соответствующим наименованием в указанных ниже объемах, перемешать пипетированием или с помощью встряхивателя и сбросить капли центрифугированием:

Реагент	Стерильная вода, мл
Позитивный контрольный образец (SalSpp)	0,25 мкл*
Протеиназа К	0,06 мкл*

2. Ресуспендируйте Позитивный контрольный образец (SalSpp) добавлением 250 мкл стерильной воды и Протеиназу К 60 мкл стерильной воды, входящей в состав набора. Тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием.

Стадия выделения ДНК

1. Приготовить раствор литического буфера и протеиназы К, согласно таблице ниже, с учётом дополнительных 20%:

Реагент	На 1 анализ	На N анализов
Литический буфер	100 мкл	100 мкл * N * 1,2
Протеиназа К	0,5 мкл	0,5 мкл * N * 1,2

2. В планшет для литической реакции поместить 100 мкл смеси из пункта 1. Далее, добавить 10 мкл полученной ночной культуры. Инкубировать полученную смесь используя следующую программу:

Темп-ра, °С	Время инкубации
56	10 мин
95	10 мин
25	1 мин

Протокол постановки ПЦР

А) Подготовка проб для проведения ПЦР

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.

1. Добавить отдельными наконечниками в пробирки планшета с лиофилизованной реакционной смесью по 25 мкл образца или контролей.
2. Осторожно перемешать без образования пузырей и сбросить капли, используя центрифугу (при этом необходимо использовать специальный ротор для микропробирок).

Контроли этапа ПЦР:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – стерильная вода;
- б) положительный контроль ПЦР – положительный контрольный образец (SalSpp,).

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 / 520 нм – зеленый спектр (FAM)
- 578/ 604 нм – желтый спектр (ROX)

Задать следующие параметры эксперимента:

Шаг	Темп-ра, °С	Время инкубации	Кол-во циклов	Измерение флуоресценции
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	1	-
Предварительная денатурация	95	3 мин	1	-
Денатурация	95	10 сек	45	-
Отжиг/Детекция	60	30 сек		FAM, ROX

В) Интерпретация результатов

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

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 C_t по каналу	
		FAM	ROX
ОКО	Выделение ДНК	Отсутствует	≤ 32
K+	ПЦР	≤ 32	≤ 32
K-	ПЦР	Отсутствует	Отсутствует

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Salmonella* spp.,
- 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 C_t 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 C_t или C_q), 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 *Salmonella Spp.*, если на канале FAM получено значение порогового цикла Ct не превышающее граничное значение – 38, а по каналу ROX не более 32;

– образец считается **отрицательным** по содержанию ДНК *Salmonella Spp.*, если на канале FAM отсутствует значение Ct или получено значение Ct более 38, а по каналу ROX не более 32.

Образец считается **сомнительным** при выполнении одного из следующих условий:

– если на канале FAM получено значение порогового цикла Ct не превышающее граничное значение – 38; а по каналу ROX сигнал отсутствует или значение Ct более 32;

– если на канале FAM в К- получено значение порогового цикла Ct менее 38, а в образце это значение больше, но не превышает 38. При этом по каналу ROX значение Ct равно или менее 32.

При получении **сомнительного** результата рекомендуется повторное исследование соответствующего образца.

Эффективность стадии выделения оценивается для каждой пробы индивидуально по присутствию в ячейке сигнала по каналу ROX.

– если сигнал в канале ROX отсутствует или значение Cq превышает 32, следовательно, выделение прошло неудачно, и тестирование образца необходимо повторить, начиная со стадии выделения.

– если в канале ROX значение Cq находится в интервале 32–38 только для одного или нескольких анализируемых образцов, а для остальных это значение ≤ 32 , следовательно, эти образцы могут содержать ингибиторы ПЦР. Для таких образцов, если есть сомнения в полученном результате, рекомендуем, либо развести образец перед внесением в ПЦР в воде в 10 раз, либо провести контрольное выделение набором на основе силикатного сорбента.

Внимание!

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (К+) по каналам FAM и ROX значение Ct отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Salmonella spp.*, начиная с этапа выделения ДНК.

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

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света.

Реагенты для выделения ДНК при комнатной температуре (15 - 25 °С) – 1 год;

Реагенты для проведения ПЦР и протеиназу К в лиофилизированном состоянии хранить:

– при +15 - +25 °С в течение 4 месяцев,

– при +2 - +8 °С в течение 1 года,

Протеиназу К и Позитивный контрольный образец (SalSpp) в ресуспендированном состоянии хранить:

– при +2 - +8 °С в течение 4 месяцев,

– при -20 °С – 1 год.

Растворы могут подвергаться разморозке/заморозке до 30 раз.

Условия транспортировки

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

Рекламации на качество тест-системы направлять по адресу производителя.