



АгроДиагностика

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК возбудителя ризомании свеклы (Beet necrotic yellow
vein virus)



ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Наборы реагентов предназначены для выявления РНК возбудителя ризомании свеклы (Beet necrotic yellow vein virus, далее BNYVV) *in vitro* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

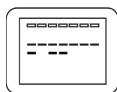
Наборы реагентов основаны на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции в смеси для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК).

В смеси для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены различными флуоресцентными метками, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК BNYVV и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплект реагентов для ПЦР-амплификации выпускается в двух форматах:



«Форез» - предназначен для детекции результатов ПЦР только методом электрофореза, флуоресцентные ДНК-зонды в смеси для амплификации отсутствуют.



«Flash» - предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора (в качестве альтернативного способа учёта результатов можно использовать метод электрофореза).

2.2 СОСТАВ НАБОРА

Наборы состоят из следующих комплектов:

а) комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из биологического материала («Проба-НК»*), включающий:

(на 50 образцов)

Реактив	Количество	
• Лизирующий раствор	20 мл	1 флакон
• Реагент для преципитации НК	20 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №1	25 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №2	15 мл	1 флакон
• Буфер для растворения НК	1,5 мл	1 флакон

О возможности использования иных комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

б) комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции:

(на 50 реакций)

Реактив	Количество	
• Буфер для ОТ	100 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
• Сумма праймеров	50 мкл	1 пробирка
• Буфер для разведения кДНК	1,5 мл	3 пробирки

в) комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК, включающий:

(на 50 образцов)

• Амплификационная смесь, запечатанная парафином	20 мкл	50 пробирок
• Минеральное масло	1 мл	1 пробирка
• Раствор Таq-полимеразы	500 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	100 мкл	1 пробирка
• Положительный контрольный образец кДНК	100 мкл	1 пробирка

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды, внутренний контрольный образец.

Буферный раствор «ПЦР-буфер» – включен только в комплекты формата «Flash».

Дополнительно, по запросу потребителей возможна поставка комплекта реагентов для детекции ДНК методом электрофореза, включающий:

• смесь для электрофореза	16,9 г	1 пакет
• агарозный гель	1 гель	5 пластин

Время проведения анализа - 4 ч.

Наборы рассчитан на проведение 50 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

Для образцов, содержащих кДНК BNYVV, после проведения реакции амплификации, ПЦР-детектор должен регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза, должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая продукту амплификации кДНК (таблица 2).

Для образцов, не содержащих кДНК BNYVV, после проведения реакции амплификации, ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая продукту амплификации кДНК (таблица 2) должна отсутствовать, при этом полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу (560 п.н.), должна быть отчетливо видна.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.2 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3 Работать с набором следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.4 При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.5 Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.6 Приготовление реакционной смеси и выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.

4.7 Для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК, проведения ПЦР и электрофореза следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

4.8 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.9 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.10 Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

4.11 Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

4.13 Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

4.14 При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с наборами реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор «Терцик» производства НПФ «ДНК-Технология»;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40...95°C;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- наконечники вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки резиновые;

При работе с набором в формате «Flash» для детекции результатов требуется:

- ПЦР-детектор.

При детекции методом электрофореза:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1 мм.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Отбор и транспортировка пораженного растительного материала проводят согласно методическим рекомендациям «Диагностика фитопатогенных вирусов методом полимеразной цепной реакции» (РАСХН, ВНИИСХБ Москва 2005).

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

ВНИМАНИЕ! При планировании пробоподготовки необходимо зарезервировать одну пробирку для получения препарата отрицательного контрольного образца (ОК) путем «выделения РНК» из пробирки не содержащей анализируемого материала и дальнейшего проведения реакции обратной транскрипции.

Примечание: в лизирующем растворе допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65°C в течение 15-20 мин.

7.1.1 От исследуемого, тщательно вымытого, корнеплода свеклы скальпелем вырезать кусочек коры с корешками, размером 3x3 мм и толщиной 1 мм (~50 мг) и гомогенизировать в 400 мкл лизирующего раствора. Гомогенат перенести в пластиковую пробирку.

7.1.2 Термостатировать пробирку в течение 20 мин при 65°C.

7.1.3 Центрифугировать пробирку 10 мин при 2000 об/мин.

7.1.4 Аккуратно, не забирая осадок, перенести надосадочную жидкость в чистую пластиковую пробирку. Добавить равный объем реагента для преципитации НК и перемешайте на вортексе.

7.1.5 Центрифугировать пробирку 15 мин при 13000 об/мин.

7.1.6 Не задевая осадок полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.7 Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирку на вортексе.

7.1.8 Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.9 Не задевая осадок полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.10 Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирку на вортексе.

7.1.11 Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.12 Не задевая осадок полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.13 Открыть крышку пробирки и высушить осадок в течении 5 мин при 65°C.

7.1.14 Добавить к осадку 50 мкл буфера для растворения НК, встряхнуть пробирку на вортексе в течение 5-10 сек.

7.1.15 Термостатировать пробирку в течение 5 мин при 65°C.

7.1.16 Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 13000 об/мин. Если образец предполагается хранить, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Препарат РНК готов для постановки реакции обратной транскрипции.

ВНИМАНИЕ! Ввиду нестабильности РНК рекомендуется провести реакцию обратной транскрипции непосредственно после выделения. РНК можно хранить при -70° не более месяца.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

7.2.1 Перед началом работы достать комплект реагентов для ОТ из морозильной камеры (за исключением обратной транскриптазы), разморозить содержимое пробирок при комнатной температуре, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

7.2.2 В отдельной пластиковой пробирке приготовить смесь ОТ (из расчета на одну пробу): к 2 мкл ОТ-буфера добавить 1 мкл суммы праймеров и 0,5 мкл обратной транскриптазы, тщательно перемешать на вортексе. При приготовлении смеси ОТ, расчет проводить по количеству анализируемых образцов с учетом отрицательного контрольного образца (N) и запасом на одну пробу (N+1).

Примечание: обратную транскриптазу следует достать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Перенести пробирку со смесью ОТ в помещение предназначенное для выделения РНК.

7.2.4 Промаркировать (N) чистых пластиковых пробирок.

7.2.5 Внести в соответствующие пробирки по 16,5 мкл препарата РНК, добавить по 3,5 мкл смеси ОТ.

Примечание: рекомендуется использовать наконечники с фильтром.

7.2.6 Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли кратковременным центрифугированием.

7.2.7 Инкубировать пробирки при температуре 40°C в течение 40 мин, а затем при температуре 95°C в течение 10 мин.

Примечание: Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например «Гном» производства НПФ ДНК-Технология)

7.2.8 Осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

7.2.9 Во все пробирки добавить по 80 мкл буфера для разведения РНК, тщательно перемешать пробирки на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

Полученный препарат кДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

ВНИМАНИЕ! Препарат кДНК хранить при минус 20°C .

7.3 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

7.3.1 Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца - «К-» и для положительного контрольного образца - «К+». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «Flash») промаркировать дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.

7.3.2 Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.3.3 В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.

7.3.4 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения ДНК из биологического материала.

7.3.5 Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.3.6 В пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.1), а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.7 В пробирки, промаркированные «ФОН», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.3.8 Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин в течение 3-5 с.

7.3.9 Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл.

После окончания амплификации пробирки перенести в помещение для проведения детекции результатов ПЦР.

Таблица 1.Режим амплификации
для амплификатора «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»)
Алгоритм регулирования: «точный»

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	93 °С	1 мин 30 с	1
2.	93 °С	20 с	5
	64 °С	5 с	
	67 °С	5 с	
3.	93 °С	1 с	40
	64 °С	5 с	
	67 °С	5 с	
4.	10 °С	хранение	

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании.

Примечание: При работе с наборами в формате «Flash» готовые нормировочные пробирки («ФОН») допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при 2-8 °С в течение 1 месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25 °С), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-ДЕТЕКТОРА.

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору. Примечание: пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10; для внутреннего контроля – 2,50.

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.

8.2.1 Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объемом 1,0 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре в течение 1 недели или при температуре 2-8 °С в течение 1 мес.

8.2.2 Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.2.3 Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие диаметром примерно 2-3 мм с помощью стальной проволоки. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в емкости с водопроводной водой.

8.2.4 Аккуратно, не повреждая лунок, внести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор. **ВНИМАНИЕ!** В каждом ряду лунок обязательно должны быть представлены положительный («K+») и отрицательный («K-») контрольные образцы.

8.2.5 Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.2.6 После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.2.7 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.2.8 Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ДЕТЕКТОРА.

- 9.1.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором.
- 9.1.2 В биологических образцах, содержащих кДНК BNYVV, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.
- 9.1.3 В биологических образцах, не содержащих кДНК BNYVV, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.
- 9.1.4 В случае отрицательного результата на наличие кДНК BNYVV и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.
- 9.1.5 При учёте результатов реакции с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат, в случае, если значение для специфики (кДНК BNYVV) попадает в зону неопределенности результатов. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.
- 9.1.6 При получении положительного результата на наличие кДНК BNYVV для отрицательного контрольного образца («К-»), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.2 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

- 9.2.1 Учет результатов реакции проводится после проведения электрофореза продуктов амплификации в агарозном геле.
- 9.2.2 Для образцов, содержащих кДНК BNYVV должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, на уровне полосы положительного контрольного образца ДНК, соответствующая продукту амплификации фрагмента кДНК (таблица 2). Наличие или отсутствие полосы ДНК внутреннего контроля в этом случае в учет не принимают.
- 9.2.3 Для образцов, не содержащих кДНК BNYVV, в том числе в отрицательном контрольном образце, полоса оранжево-красного цвета, соответствующая продукту амплификации фрагмента кДНК (таблица 2) должна отсутствовать, при этом полоса ДНК внутреннего контроля размером 560 п.н. должна быть отчетливо видна.
- 9.2.4 В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей продукту амплификации фрагмента кДНК BNYVV (таблица 2) и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контролю размером 560 п.н. результат

считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

9.2.5 В случае наличия полосы, оранжево-красного цвета, соответствующая длине продукта амплификации фрагмента кДНК (таблица 2), в отрицательном контрольном образце («К-»), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Таблица 2

Длины продуктов ПЦР-амплификации кДНК

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, п.н.
Возбудитель ризомании свеклы (Beet necrotic yellow vein virus)	320
Внутренний контроль	560

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 10.1 Срок годности наборов - 6 мес со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.
- 10.2 Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала, ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК следует хранить в тёмном месте при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.
- 10.3 Комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции следует хранить в при температуре -20 °С в течение всего срока годности.
- 10.4 Буферный раствор для электрофореза хранить при температуре 18-25 °С не более 7 дней или при температуре 2-8°С не более 1 мес.
- 10.5 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- 10.6 Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.
- 10.7 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.8 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества наборов следует обращаться в ООО «АгроДиагностика» по адресу:

117997 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая д.16/10, корп. 70
телефон: (495) 727-60-71,
e-mail: agrodiagnostica@bk.ru

