

ИНСТРУКЦИЯ

по применению наборов реагентов
для выявления ДНК сосновых стволовых нематод

Bursaphelenchus xylophilus и
Bursaphelenchus mucronatus



ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления *in vitro* ДНК сосновых стволовых нематод методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с затравками (праймерами), специфичными для фрагмента генома *Bursaphelenchus xylophilus* или *Bursaphelenchus mucronatus*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор реагентов основан на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

В наборе в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

В смесь 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 флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации ДНК соответствующей нематоды и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2 СОСТАВ НАБОРА

Набор состоит из двух комплектов:

Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала включает:

- реагент для выделения ДНК, 20 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.

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

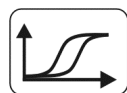
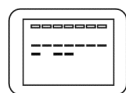
- реакционная смесь, запечатанная парафином, по 20 мкл 100 пробирок;
- раствор Таq-полимеразы, по 500 мкл 2 пробирки;
- буферный раствор ПЦР-буфер, 200 мкл 1 пробирка;
- минеральное масло, по 1,0 мл 2 пробирки;
- положительный контрольный образец (К+), 150 мкл 1 пробирка.

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».

В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплект реагентов для ПЦР-амплификации выпускается в трёх 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).

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

- смесь для электрофореза, 16,9 г 1 пакет;
- агарозный гель, 5 пластин.

2.3 Время проведения анализа - 4 ч.

2. Набор рассчитан на проведение 100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

В образцах биологического материала, содержащих ДНК соответствующей нематоды, после проведения реакции амплификации, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза, должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома *Bursaphelenchus xylophilus* или *Bursaphelenchus mucronatus* размером 280 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК соответствующей нематоды, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса, соответствующая фрагменту генома *нематоды* размером 280 п.н., отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор (для наборов в форматах «Форез» и «Flash») или детектирующий амплификатор (для наборов в формате «Real-time»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный с прижимной крышкой, поддерживающий температуру 98°C (например «ГНОМ» производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология»);
- 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;
- пестики-гомогенизаторы для пробирок пластиковых объемом 1,5 мл.

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 1,0 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1,0 мм.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Для исследования с помощью наборов BURSAPHELENCHUS MUCRONATUS или BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS могут быть использована культура нематод, выделенная из древесины.

6.2 Отбор материала для исследования и выделение нематод проводят согласно соответствующим методическим указаниям.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ СУСПЕНЗИИ НЕМАТОД

7.1.1 20 мкл суспензии нематод поместить в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, добавить 180 мкл реагента для выделения ДНК, перемешать и инкубировать 10 мин на кипящей водяной бане.

7.1.2 Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец (ОК). Для этого в отдельную пластиковую пробирку вместимостью 1,5 мл внести 200 мкл реагента для выделения ДНК.

7.1.3 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в смесь для амплификации.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2-8 °С или при температуре минус 20 °С не более 6 месяцев.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

- 7.2.1 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.
- 7.2.2 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.
- 7.2.3 В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.
- 7.2.4 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенное для выделения ДНК из биологического материала.
- 7.2.5 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 аэрозольными барьерами.
- 7.2.6 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.
- 7.2.7 В пробирки, промаркированные «ФОН», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.
- 7.2.8 Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) течение 3-5 с.
- 7.2.9 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. Форматы «Форез» и «Flash».
Алгоритм регулирования: «точный»

Температура	Время	Кол-во повторов
93°C	1 мин 30 сек	1
93°C 64°C 67°C	20сек 5сек 5сек	5
93°C 64°C 67°C	1сек 5сек 5сек	40
10°C	хранение	

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

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2-8 °С не более 1 мес или при температуре минус 20°C в течение 12 мес.

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 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.

8. 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 («К+») и отрицательный («К-») 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 или детектирующим амплификатором.
- 9.1.2 В биологических образцах, содержащих ДНК *Bursaphelenchus xylophilus* или *Bursaphelenchus mucronatus*, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.
- 9.1.3 В биологических образцах, не содержащих ДНК *соответствующей нематоды*, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.
- 9.1.4 В случае отрицательного результата на наличие ДНК *соответствующей нематоды* и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.
Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторный отбор биологического материала.
- 9.1.5 При учёте результатов реакции с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат, в случае, если значение для специфики (наличие ДНК *нематоды*) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).
- 9.1.6 При получении положительного результата на наличие ДНК *Bursaphelenchus xylophilus* или *Bursaphelenchus mucronatus* 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 В положительных образцах должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, на уровне полосы положительного контрольного образца ДНК, соответствующая фрагменту ДНК *Bursaphelenchus xylophilus* или *Bursaphelenchus mucronatus* размером

280 п.н. Наличие или отсутствие полосы ДНК внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимают.

9.2.2 В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту ДНК *Bursaphelenchus xylophilus* или *Bursaphelenchus mucronatus* размером 280 п.н., должны отсутствовать, а полоса внутреннего контрольного образца размером 560 п.н. должна быть отчетливо видна.

9.2.3 В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту ДНК *Bursaphelenchus xylophilus* или *Bursaphelenchus mucronatus* размером 280 п.н. и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н. результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.2.4 В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту ДНК *Bursaphelenchus xylophilus* или *Bursaphelenchus mucronatus* размером 280 п.н., в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Срок годности набора - 6 мес со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала, ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК следует хранить в тёмном месте при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Буферный раствор для электрофореза хранить при температуре 18-25°C не более 7 дней или при температуре 2-8°C не более 1 мес.

Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора. Допускается транспортирование набора не более 7 дней при температуре 2-8°C.

Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора, 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