НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «List-ПЦР/РВ» предназначен для выявления ДНК L. monocytogenes в биологическом материале, объектах окружающей среды, жидких средах для первичного обогащения продукта питания методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. В основе метода лежит амплификация специфических участков ДНК L. monocytogenes с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и зондов.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных производителем.

Набор реагентов рассчитан для постановки 50 реакций, включая контроли.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма и ДНК экзогенного ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК L. monocytogenes при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Результат амплификации ДНК L. monocytogenes регистрируется на канале ««FAM», результат амплификации внутреннего контроля регистрируется на канале флуоресценции «ROX».

СОСТАВ

Наименование компонента	Количество/ объем
ПЦР-смесь 1	1 пробирка/805мкл
ПЦР- смесь 2	1пробирка/285 мкл
Taq-полимераза	1 пробирка/10 мкл
ПКО	1 пробирка/150мкл
ОКО	1 пробирка/150мкл
ВКО	1пробирка/500мкл

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Постановка ПЦР осуществляется в 2 рабочих зонах:

- Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) - экстракция ДНК из исследуемых образцов.

- Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) - подготовка проб и контролей, внесение проб в пробирки с ПЦР-реагентами, проведение амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени», учет результатов.

Во избежание контаминации продуктами ДНК запрещается переносить пробы, дозаторы, наконечники, штативы, микропробирки из одной зоны в другую.

При переходе из одной зоны в другую необходимо менять халат и перчатки.

Работы следует проводить в одноразовых перчатках без талька.

Одноразовые пластиковые пробирки, наконечники сбрасываются в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор. На каждом этапе используют

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьерным фильтром.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать набор по истечении срока годности.

Материалы и оборудование:

- набор реагентов для выделения ДНК, рекомендованный производителем для соответствующих образцов (биологический материал, пищевые продукты);
- настольный бокс с бактерицидной лампой либо ламинарный шкаф (любой марки);
- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа (например Rotor Gene 3000/6000 Corbet, либо аналогичный);
- вортекс(любой марки)
- набор автоматических пипеток переменного объема 0,5-10 мкл, 200 мкл, 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;
- пробирки РНК- и ДНК-free типа «Эппендорф» на 0,2 мл для ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала через дно пробирки;
- пробирки РНК- и ДНК-free типа «Эппендорф» на 1,5 мл
- штативы для наконечников, микропробирок;
- холодильник на 2 – 8°С, морозильник на минус 20°С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение ДНК проводиться в зоне 1 согласно инструкции производителя к используемому набору для выделения ДНК. Выделение ДНК L. monocytogenes из образцов продуктов питания проводят после предварительного обогащения образца. Дальнейшее выявление ДНК L. monocytogenes в культуральной среде проводят без ее дополнительной обработки в соответствии с инструкцией к набору реагентов. Контрольные образцы (ОКО, ПКО) используются только для контроля реакции амплификации.

ВНИМАНИЕ! Комплект реагентов для выделения ДНК из исследуемых образцов не входит в состав набора.

Внутренний контрольный образец (ВКО) 10 мкл вносится на этапе экстракции ДНК в каждый исследуемый образец для контроля этапа выделения генетического материала.

Подготовка ПЦР-смеси проводиться в зоне 2

1. Все реагенты следует разморозить, перемешать содержимое пробирок, (перевернув пробирки несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Промаркировать пробирки на необходимое количество проб, пробирки с положительным и отрицательным контролями.
3. Для проведения анализа одного образца необходимо:

ПЦР-смесь 1 – 16,1 мкл

ПЦР-смесь 2 –5,7 мкл

Taq-полимераза 0,2 мкл

4. В пробирке объемом 1,5 мл смешать реагенты исходя из количества анализируемых проб, аккуратно перемешать, разнести по 22 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Используя наконечник с фильтром добавить по 3 мкл ДНК исследуемых образцов, а также отрицательный и положительный контроли амплификации (К+ и К-: по 3 мкл ПКО и ОКО соответственно), пипетировать. Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор (Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research).

2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице:

Параметры амплификации

Этап	Время	Температура
1 цикл преденатурация	3мин	94°С
40 циклов: денатурация отжиг праймеров/элонгация	15сек 15сек	94°С 53°С

Анализ результатов

1. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

– активировать функции «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона».

После проведения реакции необходимо выставить значения пороговой линии: 10 % от максимального уровня флуоресценции положительного контрольного образца для каждого канала.

Регистрация и оценка результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующим уровне пороговой линии, что определяет наличие (или ,соответственно, отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла Ct(<35). Результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в реальном времени S-образный вид, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, определено значение порогового цикла меньше граничного. Отрицательным в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения Ct либо его значение выше граничного) и сомнительным во всех других случаях.

Образец	Значение Ct по каналу Fam	Значение Ct по каналу ROX	Результат
1	Нет значений (N/A)	Нет значений (N/A)	Неинтерпретируемый
2	Нет значений (N/A)	Определено значение меньше граничного	ДНК L.monocytogenes не обнаружено
3	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	ДНК L.monocytogenes обнаружено

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного (ПКО) и отрицательного (ОКО) контролей амплификации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Аналитическая чувствительность тест-системы 10^3 ГЭ/мл, диагностическая чувствительность и специфичность – не менее 95%.

ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов выпускается в виде упакованного набора. Один набор рассчитан на постановку 50 реакций.

Срок годности, условия хранения и транспортирования

Набор реагентов (все его компоненты) транспортировать и хранить в морозильной камере при температуре не выше минус 20°С.

Срок годности при соблюдении условий хранения составляет 9 месяцев с даты изготовления.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru