ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления ДНК животных рода азиатские буйволы (*Bubalus* spp.) в продуктах питания, кормах, сырье и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Буйвол»

АмплиПрайм® Буйвол

REF V2140-1Z

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пробы ДНК, экстрагированные из образцов указанного ниже материала:

- ✓ продукты питания и корма, содержащие компоненты растительного происхождения (заменители молока, печенье, каши, хлопья, шрот, текстураты и т.п.);
- ✓ продукты питания, полуфабрикаты, сырье и корма животного происхождения (кормовые добавки, комбикорма, мясокостная мука, консервы и т.п.);
- ✓ биологический материал (внутренние органы, части туши)

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь Буйвол	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка
Буфер В	Прозрачная жидкость	0,60	1 пробирка
ПКО Буйвол	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
К-	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	-
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Вкладыш для автоматической обработки результатов	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С … 8°С в защищенном от света месте

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® Буйвол». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО В / ВКО-FL[1]	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы[2]	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	50 - 100 мкл	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-Буйвол	**10,0***(N+1)	**N** – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	**5,0***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением исследования.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Буйвол** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ПЦР исследуемых и контрольных образцов.

5. Внести в пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	В пробирку для исследуемых образцов
Проба, экстрагированная из ОКО	В пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
Реагент ПКО Буйвол	В пробирку для ПК (положительного контроля)
Реагент К-	В пробирку для К- (отрицательного контроля ПЦР)

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

6. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

[1] Входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

[2] Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу инструкции «Исследуемый материал».

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[3]	

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Выставить рекомендуемые настройки в зависимости от типа используемого амплификатора.

Рекомендуемые настройки для приборов роторного типа

Канал	Оптимизация уровня сигнала	Порог	Устранение выбросов	Корректировка уклона	Динамический фон	Исключить циклы
FAM/Green	от 5 Fl до 10 Fl	0,05	10 - 15 %	включена	включен	от 1 до 10
R6G/Yellow	от 5 Fl до 10 Fl	0,05	10 - 15 %	включена	включен	от 1 до 10

При запуске прибора роторного типа в окне «Автооптимизация уровня сигнала» активировать функцию «Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции».

При использовании амплификатора «CFX96» следует применять настройки, указанные ниже.

Настройки для прибора «CFX96»

Параметр	Шаг этапа циклирования	Скорость нагревания/охлаждения
Step Options	95 °С	2,5 °С/sec
	60 °С	2,5 °С/sec

Анализ результатов для прибора «CFX96»

Провести анализ результатов по каналам **FAM** и **R6G** (для каждого канала по отдельности), активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.

Для настройки базовой линии выберите меню **Settings** (Настройки), затем последовательно нажмите кнопки **Base Line Subtracted Curve Fit** (Подбор кривой по точкам с вычетом базовой линии) и **Apply Fluorescence Drift Correction** (Применить коррекцию смещения флуоресценции). В меню **Threshold Cycle Calculation** (Пороговый уровень базовой линии) выбрать режим ручной установки пороговой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** (Циклы базовой линии) выбрать **Auto Calculated** (Рассчитан автоматически), а в подменю **Single Threshold** (Единый пороговый уровень) выбрать **User Defined** (Определен пользователем) и применить настройки, указанные ниже.

Рекомендуемые настройки для приборов планшетного типа

Канал	Threshold / Порог	Исключить циклы
FAM	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 - 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ОК в последнем цикле амплификации.	от 1 до 10
R6G	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ПКО Буйвол в последнем цикле амплификации.	от 1 до 10

7. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание: необходимо перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно краткому руководству, прилагаемому к набору.

Анализ и обработку результатов можно проводить:

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

– в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению, инструкции по применению набора и краткому руководству, прилагаемому к набору.

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	**Значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов по каналу флуорофора**	
	FAM	**R6G**
ПКО Буйвол (положительный контроль)	Отсутствует	Определено Ct ≤ 29,0 / ≤ 32,5
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено Ct ≤ 29,0 / ≤ 32,5	Отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	**Интерпретация**
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G отсутствует**, при этом **значение Ct по каналу** для флуорофора **FAM определено ≤ 40,0 / ≤ 40,0.**	**ДНК животных рода азиатские буйволы (*Bubalus* spp.) не обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G определено ≤ 40,0 / ≤ 40,0.** Кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. **Значение Ct по каналу** для флуорофора **FAM определено или отсутствует.**	**ДНК животных рода азиатские буйволы (*Bubalus* spp.) обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G определено > 40,0 / > 40,0**, при этом **значение Ct по каналу** для флуорофора **FAM определено ≤ 40,0 / ≤ 40,0.**	**Результат недостоверный / сомнительный** Рекомендуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G отсутствует или определено ≥ 45,0 / ≥ 45,0**, при этом **значение Ct по каналу** для флуорофора **FAM отсутствует или определено > 40,0 / > 40,0.**	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

ВНИМАНИЕ! В случае получения сомнительного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения сомнительного или получения отрицательного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование, начиная с этапа отбора материала.