

CONGEN

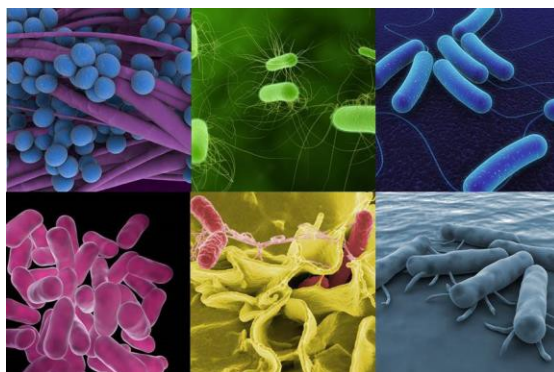
SureFast®

Clostridium estertheticum PLUS

Art. No. F5160

100 определений
(07-2019)

Инструкция



Июль 2019

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор
в России:**

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54



1 Общая информация

1.1 Описание

SureFast® Clostridium estertheticum PLUS – это ПЦР в реальном времени для прямого качественного обнаружения специфической последовательности ДНК Clostridium estertheticum. Каждая реакционная смесь содержит внутренний контроль амплификации (IAC). Если образец содержит вещества, ингибирующие ПЦР, то это повлияет на сигнал контроля амплификации или амплификация будет подавлена. Примерами веществ, ингибирующих ПЦР, являются спирты (например, этанол, изопропанол), поверхностно-активные вещества (например, СТАВ, SDS, Triton X100) и соли (например, хлорид натрия). Кроме того, специи, травы, водоросли, какао и другие образцы матриц могут оказывать ингибирующее действие на ПЦР.

Анализ ПЦР в реальном времени можно проводить с помощью широко используемых приборов, оборудованных для обнаружения двух флуоресцентных эмиссий в каналах FAM и VIC/HEX. Валидация набора была проведена на Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Qiagen Rotor-Gene Q, LTF MyGo Pro и R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Предел обнаружения

SureFast® Clostridium estertheticum PLUS имеет предел обнаружения <5 копий ДНК. Предел обнаружения анализа зависит от матрицы, степени обработки, подготовки ДНК и содержания ДНК.

1.3 Выделение ДНК

Для подготовки ДНК рекомендуется использовать SureFast® PREP Bacteria или SureFast® Speed PREP. Для оценки процесса роста бактерий предлагается сравнить образцы в начале и в конце культивирования (рост бактерий при разнице $C_p > 3$).

1.4 Состав набора

Код реагента	Реагент	Количество	Цвет крышки
1	Реакционная смесь	2 x 1100 мкл	Желтый
2	Тақ Полимераза	1 x 80 мкл	Темно-красный
3	Положительный контроль	1 x 200 мкл	Светло голубой

Храните все реагенты при -20 °С в защищенном от света месте. Полимеразу Тақ можно хранить при температуре от +2 до + 8 °С для многократного использования в течение одного дня.

Примечание. Полимераза Тақ может быть в замороженном или незамороженном состоянии. Это не влияет на качество Тақ-полимеразы или производительность ПЦР.

1.5 Необходимое оборудование и материалы:

- набор для экстракции ДНК (например, SureFast® PREP Bacteria Art. No. F1021);
- прибор для ПЦР в реальном времени с двумя каналами обнаружения (510 нм, 580 нм);
- расходные материалы для ПЦР в реальном времени (планшеты, пробирки, капилляры, фольга, крышки);
- пипетки с наконечниками с фильтрами;
- одноразовые перчатки без порошка;
- вихревой смеситель;
- микроцентрифуга с ротором для реакционных пробирок.

1.6 Установочные параметры термоциклера

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LightCycler® 480 II & LTF MyGo Pro
Начальная денатурация (HOLD) Циклы Денатурация Отжиг/Элонгация (CYCLE)	1 мин, 95°C, 45 15 с, 95°C 30 с, 60°C	1 мин, 95°C 45 10 с, 95°C 15 с, 60°C
Скорость температурного перехода/ Ramp Rate	Максимум	Максимум

1.7 Настройка канала обнаружения

Прибор	Детекция	Детектирующий канал	Тушитель	Примечание
Agilent Mx3005P	<i>Clostridium estertheticum</i>	FAM	+	Проверьте пассивный эталонный краситель ROX с настройкой «нет».
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	<i>Clostridium estertheticum</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	<i>Clostridium estertheticum</i>	FAM	Нет	
	IAC	VIC	Нет	
Bio-Rad CFX96	<i>Clostridium estertheticum</i>	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Clostridium estertheticum</i>	Green	+	
	IAC	Yellow	+	
LTF MyGo Pro	<i>Clostridium estertheticum</i>	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Clostridium estertheticum</i>	Green	+	
	IAC	Yellow	+	

Roche LightCycler® 2.0	<i>Clostridium estertheticum</i>	530	Нет	Необходим SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010). Проверьте температуру поиска «Seek Temperature» - 58°C.
	IAC	560	Нет	
Roche LightCycler® 480 II	<i>Clostridium estertheticum</i>	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>Clostridium estertheticum</i>	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

2 Качественный анализ

2.1 Протокол

2.1.1 Приготовление мастер-микса

Рассчитайте общее количество необходимых реакций (образцы и контрольные реакции) для конкретного ПЦР-анализа, а также для проведения контроля ингибирования. Рекомендуемые контрольные реакции для конкретного ПЦР-анализа: отрицательный контроль, экстракционный контроль, положительный контроль. Рекомендуются для анализа обогащенных образцов использовать дополнительные контроли: нулевой контроль (образец до обогащения) и контроль среды. Реакционная смесь содержит внутренний контроль амплификации (IAC).

Реакции, необходимые для качественного обнаружения:

3 реакции для контролей (1x контроль без матрицы, 1x контроль экстракции, 1x положительный контроль).

Для каждого образца: минимум 1 реакция на каждый образец ДНК.

Реакции, необходимые для качественного обнаружения в обогащенных образцах:

5 реакций для контролей (1x контроль без матрицы, 1x контроль экстракции, 1x положительный контроль, 1x нулевой контроль, 1x контроль среды).

Для каждого образца: минимум 1 реакция на каждый образец ДНК.

Также рекомендуется приготовить мастер-микс с 10% избытком объема, чтобы компенсировать потерю реагента. Дайте реагентам оттаять, перемешайте и центрифугируйте перед открытием и использованием.

Пример расчета и подготовки 10 реакций:

Компоненты для мастер-микса	Объем на 1 реакцию	10 реакций (с 10% избытком)
Реакционная смесь	19.3 мкл	212.3 мкл
Тaq Полимераза	0.7 мкл	7.7 мкл
Общий объем	20 мкл	220 мкл

Хорошо перемешайте мастер-микс и центрифугируйте до использования.

2.1.2 Приготовление смеси для ПЦР в реальном времени

- Внесите пипеткой 20 мкл мастер-микса в соответствующие пробирки/лунки.
- Закройте пробирку с отрицательным контролем (отрицательный контроль готов к ПЦР).
- Внесите пипеткой 5 мкл образца в указанные пробирки/лунки или капилляры.
- Внесите пипеткой 5 мкл положительного контроля в указанные пробирки/лунки или капилляры.
- Центрифугируйте все пробирки / лунки или капилляры на низкой скорости.
- Поместите пробирки / лунки или капилляры в прибор для ПЦР в реальном времени и запустите цикл в соответствии с настройками.

2.2 Интерпретация результатов

Оценка должна выполняться в соответствии с обычной программой анализа, рекомендованной производителем прибора для ПЦР в реальном времени.

Контрольные реакции должны давать правильные результаты.

ДНК *Clostridium estertheticum* обнаруживается в FAM-канале. В канале VIC/HEX осуществляется контроль амплификации.

Образец считается положительным, если наблюдается амплификация в соответствующем канале (FAM-канале).

Образец считается отрицательным, если амплификации не наблюдается в соответствующем канале (FAM-канале) и если внутренний контроль (VIC/HEX-канал) образца является положительным со сдвигом значения $C_p < 2$ по сравнению с отрицательным контролем.

Если образец ДНК в VIC/HEX-канале не показывает амплификации или сдвига значения $C_p > 2$ по сравнению с отрицательным контролем, то он содержит вещества, ингибирующие ПЦР. Значительное снижение сигнала флуоресценции также может указывать на присутствие веществ, ингибирующих ПЦР. В этих условиях необходимо улучшить выделение ДНК и очистку образца. В качестве альтернативы ДНК можно разбавить (рекомендация 1: 2 в воде для ПЦР) и снова проанализировать на ингибирование. Обратите внимание, что коэффициент разбавления также влияет на предел обнаружения *Clostridium estertheticum* R.