



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-ДНК-ПЛОТЯДНЫХ-1-ФАКТОР», для выявления ДНК пушных зверей в кормах методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле

ТУ 21.10.60-342-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора.....	4
2.1. Принцип действия.....	4
2.2. Состав набора	4
3. Аналитические и диагностические характеристики	6
5.1. Для зоны выделения ДНК:	6
5.2. Для зоны проведения ПЦР анализа:	7
7. Проведение анализа	9
7.1. Экстракция (выделение) НК	9
7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР	9
8 Интерпретация результатов анализа	11
9. Условия транспортирования	12
10. Условия хранения	12
11. Срок годности	12
Приложение 1. Приготовление реакционной смеси	13
Приложение 2. Лист вносимых изменений	14

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарно-эпидемиологические правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор предназначен для выявления ДНК пушных зверей семейства куньих *Mustelidae* (в том числе *Mustela lutreola* европейской норки, *Mustela nivalis* ласки обыкновенной, *Mustela erminea* горностая, *Mustela sibirica* колонка; *Martes zibellina* соболя; американской норки *Neovison vison*) в кормах и кормовых добавках, методом амплификации ДНК в присутствии внутреннего положительного контроля с последующей детекцией продуктов амплификации электрофорезом в агарозном геле.

Данный набор служит для исключения фальсификации и контаминации кормов, предназначенных для пушного звероводства, тканями плотоядных семейства куньих (*Mustelidae*).

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

Набор реагентов позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома пушных зверей семейства куньих (*Mustelidae*) и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага Т4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Анализ результатов ПЦР-амплификации осуществляется методом электрофореза в агарозном геле.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) Для анализа 55 клинических образцов (включая контрольные образцы)
- 2) Для анализа 110 клинических образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Комплект №1 для проведения ПЦР

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Кол-во
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР ПЛТ-1	жидкость темно-зеленого цвета	830	1660	1
2	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	30	60	1
3	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	Прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1
4	Минеральное масло МИН. МАСЛО	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2000	4000	1(2)

Таблица 2. Комплект №2 контрольные образцы

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО Т1¹	прозрачная бесцветная жидкость*	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)²	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО ПЛТ-1	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

¹ Возможна легкая опалесценция

² Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

Для выделения ДНК из кормов и кормовых добавок рекомендуется использовать набор «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» или аналогичный.

В набор реагентов не входят реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР» или аналогичный.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК других видов животных, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Canis lupus*, *Gadus chalcogrammus*, *Clupea harengus*, *soi Glycine max*, кукурузы *Zea mays* и ДНК человека.

4. Меры предосторожности

Исследование проводится согласно МУ 1.3. 2569 -09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты, 0,2%).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

5. Материалы и оборудование

5.1. Для зоны выделения ДНК:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);

- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, фирмы «Ахуген», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК (см. пункт 2.2).

5.2. Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Терцик», ДНК-технология).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема на 2-20, 20-200 и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 и 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 мл (например, «Хеликон», Россия).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,5 и 1,5 мл (например, «Ахугене», США);
- Штативы для микропробирок на 0,5 и 1,5-2,0 мл (например, «Хеликон», Россия);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

5.3 Для зоны электрофоретического анализа

- Камера для горизонтального электрофореза (например: «SE2», «Хеликон»);

- Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например: Эльф-4, «ДНК-технология»);
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например: «Vilber Lourmat»);
- Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (например: «Vilber Lourmat»), «Биотест-1»);
- Микроволновая печь для плавления агарозы;
- Колба коническая на 250-300 мл из термостойкого стекла для приготовления агарозы;
- Мерный цилиндр на 1 л для приготовления буфера для электрофореза;
- Штатив для микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- Отдельная автоматическая пипетка на 10-50 мкл;
- Одноразовые наконечники до 200 мкл;
- Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромистый этидий;
- Отдельный халат и одноразовые перчатки;

6. Подготовка материала к исследованию, транспортировка и хранение проб

Отбор исследуемых образцов проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья и кормов.

От пробы плотной консистенции отбирают на исследование общую пробу весом 10-50 г.

Гранулированную или консервированную продукцию перед исследованием (10-20 г) растирают в ступке до однородного состояния. Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 мл.

Лабораторные пробы отбирают на исследование и тестируют в двух повторях.

Отбирают лабораторные пробы (20 — 40 мг) в одноразовые микропробирки вместимостью 1,5 мл и направляют на выделения ДНК.

Образцы продукции рекомендуется хранить в течение 1 мес (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта. Образцы скоропортящейся продукции рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре не выше минус 16 °С) в течение 1 мес (при необходимости повторного анализа).

Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения конкретной продукции. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-Ф-ДНК-ПЛОТЯДНЫХ-1-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК*;
- проведение ПЦР;
- анализ продуктов амплификации методом электрофореза**
- учет результатов анализа.

* - см. пункт 2.2

** - для электрофоретического анализа необходим дополнительный комплект реактивов. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР» или аналогичный.

7.1. Экстракция (выделение) НК

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл. Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения ДНК, в пробирку отрицательного контроля (ВК-) вместо исследуемой пробы внести **ОКО³** (пробирку обозначить как ВК-).

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО Т1**.

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО Т1**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции, к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения (ВК-) вместо исследуемой пробы внести **ОКО (пробирку обозначить как ВК-)**.

Выделять НК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК

7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО ПЛТ-1, ВКО Т1** и ДНК буфера.

В отдельной пробирке смешать следующие компоненты набора реагентов из расчета на каждую реакцию (расчеты объемов **ПЦР СМЕСИ ПЛТ-1** и полимеразы на различное количество реакционных пробирок приведены в приложении 1):

³ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

- **15 мкл ПЦР СМЕСЬ ПЛТ-1;**
- **0,5 мкл TAQ POLYMERASE**

Перемешать смесь на вортексе (без вспенивания), после чего сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых ДНК и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

В случае использования амплификаторов без подогревающейся крышки («Терцик», «ДНК технология») сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл:

а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ДНК буфера;

б) в пробирки для исследования по 10 мкл НК из исследуемых образцов (включая ВК-, см. п.7.1);

в) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ПЛТ-1.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор встряхнуть пробирки, после чего осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-2 секунды). Установить пробирки в амплификатор. Режим термоциклирования приведен в Таблицах 3,4.

Таблица 3. Температурно-временной режим амплификации (Терцик, 0,5 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим (точный)	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 10 сек	42
	58°C – 20 сек	
	72°C – 20 сек	
3	72 °C – 2 мин	1

После окончания реакции переставить пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР.

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре. Для длительного хранения требуется заморозка.

Анализ продуктов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле.

В случае использования аналогичных приборов рекомендуется консультация со специалистом компании «ВЕТ ФАКТОР».

7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Внимание: Работа с амплифицированными продуктами должна производиться в отдельной комнате сотрудником, не производящим манипуляций в чистых помещениях.

Поставить электрофорез исследуемых и контрольных проб согласно инструкции производителя набора для детекции амплифицированной ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

После завершения программы амплификации отработанные пробирки и гели утилизируют в соответствии с МУ 1.3. 2569 -09.

8 Интерпретация результатов анализа

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной НК (см. табл. 4).

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения нуклеиновых кислот.

Таблица 4. Оценка результатов анализа.

Проба	Полоса на электрофореграмме		Результат
	285 п.н.	150 п.н.	
	<i>Mustelidae</i>	<i>ВКО</i>	
ПКО К+	есть	есть	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
ДНК буфер К-	нет	нет	Реакция прошла успешно
	есть	нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	нет	есть	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО ВК-	нет	есть	Экстракция прошла успешно
	есть	есть или нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	нет	нет	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Образцы	есть	есть или нет	Результат анализа положительный. <i>ДНК семейства куньих (Mustelidae) обнаружена</i>
	нет	есть	Результат анализа отрицательный
	нет	нет	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

В случае, если в ВК- отсутствует полоса ВКО, а в К+ и исследуемых образцах полоса ВКО присутствует – результаты можно считать достоверными. Также в случае полоса ВКО в К+ отсутствует, а в ВК- и образцах присутствует – результаты можно считать достоверными.

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения Ct для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения Ct на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации.

9. Условия транспортирования

Транспортирование набора «ПЦР-Ф-ДНК-ПЛОТОЯДНЫХ-1-ФАКТОР» должно производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10. Условия хранения

Хранение комплектов набора «ПЦР-Ф-ДНК-ПЛОТОЯДНЫХ-1-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

11. Срок годности

Срок годности реагентов «ПЦР-Ф-ДНК-ПЛОТОЯДНЫХ-1-ФАКТОР» 12 месяцев.

Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Приготовление реакционной смеси

Количество реакций	Объем ПЦР ПЛТ-1, мкл	объем TAQ POLYMERASE, мкл
3	45	1,5
4	60	2
5	75	2,5
6	90	3
7	105	3,5
8	120	4
9	135	4,5
10	150	5
15	225	7,5
20	300	10
25	375	12,5
30	450	15
35	525	17,5
40	600	20
45	675	22,5
50	750	25
55	825	27,5

Приложение 2. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 18.11.2020	Пункт 7. Проведение анализа	Изменен температурно-временной режим амплификации
Версия 1.2 от 26.05.2021	стр. 5, стр. 9	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.3 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-Ф-ДНК-ПЛОТОЯДНЫХ-1-ФАКТОР» или по вопросам приобретения тест-систем нашего производства просьба обращаться в

ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:

108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: vet@faktor.ru