



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal



**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ
ПРОЦЕДУРА ВЫЯВЛЕНИЕ
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ
СВИНЕЙ МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ (ПЦР) С
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ
ДЕТЕКЦИЕЙ.**

jmvizcaino@vet.ucm.es
Av/ Puerta de Hierro s/n.
28040 Madrid.

Tel: (34) 913944082
Fax: (34) 913943908



1. ПРОБОПОДГОТОВКА

Смотрите видео (Гомогенизация ткани и выделение ДНК)

1.1 МАТЕРИАЛЫ

- Емкость со льдом
- Гипохлорит натрия до 50%
- Гомогенизатор
- Клейкая лента
- Маркер
- Штатив с пробирками объемом 10 мл
- Штатив с пробирками для микроцентрифуги
- Серологические пипетки
- Фильтровальная бумага
- Латексные перчатки
- Устройство для набора жидкости (Pipetboy, резиновая груша)

1.2 РЕАКТИВЫ

ФСБ буфер pH 7.2:

ClNa [Merck 1.06404]	-----	8 г
ClK [Merck 1.04873]	-----	0,2 г
PO ₄ H ₂ K [Merck 1.06586]	-----	0,2 г
PO ₄ HNa ₂ [Merck 1.04936]	-----	1,15 г
Дистиллированная вода	-----	1000 ml

Проверить pH перед использованием. Хранить при 4°C

1.3 МЕТОДОЛОГИЯ

- 1.3.1 Пронумеровать образцы
- 1.3.2 Отрезать приблизительно 1 г ткани от исследуемого образца
- 1.3.3 Подписать позиции в гомогенизаторе
- 1.3.4 Перенести образец ткани в гомогенизатор
- 1.3.5 Добавить 10 мл 1X ФСБ и гомогенизировать образец



1.3.6 Промаркировать микроцентрифужные пробирки

1.3.7 Приготовить аликвоты суспензии в микроцентрифужных пробирках.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Смотрите видео (Гомогенизация ткани и выделение ДНК)

2.1 МАТЕРИАЛЫ

- Штатив с пробирками для микроцентрифуги
- Латексные перчатки
- Емкость со льдом
- Гипохлорит натрия до 50%
- Маркер
- Водяная баня
- Центрифуга
- Изопропанол
- Вортекс
- **High Pure PCR Template Preparation Kit** (Roche Diagnostics, ref: 11796828001)

Подготовка рабочих растворов:

- **Лиофилизованная Протеиназа К:** растворить Протеиназу К в 4,5 мл стерильной дистиллированной воды. Приготовить аликвоты раствора в пробирках на 500 мкл. Хранить при -20°C до использования.
- **Буфер удаления ингибиторов:** Добавить 20 мл абсолютного спирта во флакон, входящий в состав набора. Промаркировать емкость.
- **Отмывочный буфер:** Добавить 80 мл абсолютного спирта во флакон входящий в состав набора. Промаркировать емкость.

2.2 МЕТОДОЛОГИЯ

2.2.1 Промаркировать микроцентрифужные пробирки

2.2.2 Добавить 200мкл Связывающего буфера в микроцентрифужные пробирки.

2.2.3 Добавить 40 мкл Протеиназы К.

2.2.4 Добавить 200 мкл образца.

2.2.5 Немедленно перемешать переворачивая пробирки.

2.2.6 Инкубировать 10 минут при 72°C

2.2.7 Кратковременно центрифугировать.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal

- 2.2.8 Поместить High Pure filter tube (фильтровальную пробирку) в collection tube (пробирку для сбора). Подписать пробирку для сбора и перенести жидкость из микроцентрифужной пробирки в верхний резервуар фильтровальной пробирки.
- 2.2.9 Центрифугировать 1 минут при 8000 об/мин.
- 2.2.10 Удалить пробирку для сбора и поместить фильтровальную пробирку в чистую пробирку для сбора
- 2.2.11 Добавить 500 мкл буфера для удаления ингибиторов.
- 2.2.12 Центрифугировать 1 минуту при 8000 об/мин.
- 2.2.13 Удалить пробирку для сбора и поместить фильтровальную пробирку в чистую пробирку для сбора.
- 2.2.14 Добавить 450 мкл Отмывочного буфера.
- 2.2.15 Центрифугировать 1 минуту при 8000 об/мин
- 2.2.16 Удалить пробирку для сбора и поместить фильтровальную пробирку в чистую пробирку для сбора.
- 2.2.17 Добавить 450 мкл Отмывочного буфера повторно.
- 2.2.18 Центрифугировать 1 минуту при 8000 об/мин.
- 2.2.19 Удалить пробирку для сбора и поместить фильтровальную пробирку в чистую пробирку для сбора
- 2.2.20 Центрифугировать 10 секунд при 13000 об/мин.
- 2.2.21 Нагреть стерильную дистиллированную воду до 70°C
- 2.2.22 Подписать новые микроцентрифужные пробирки (1,5 мл) для хранения ДНК.
- 2.2.23 Поместить фильтровальные пробирки в подписанные микроцентрифужные пробирки (1.5ml)
- 2.2.24 Добавить 50 мкл стерильной дистиллированной воды подогретой до 70°C
- 2.2.25 Центрифугировать 1 минуту при 8000 об/мин.
- 2.2.26 Удалить фильтровальную пробирку и хранить при -20°C.

3. ПЦР С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

Смотрите видео (ПЦР с электрофоретической детекцией)

3.1 МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Микropипетки объемом 1-20, 20-200, и 200-1000 мкл
- Миксер для пробирок или вортекс
- Микроцентрифуга для пробирок типа Эппендорф
- Термоблок или водяная баня
- Штатив для пробирок



- Стандартный амплификатор с нагреваемой крышкой
- Камера для горизонтального электрофореза, мостик, гребенки и электроды
- Источник питания
- У/Ф трансиллюминатор
- Холодильник на 4 °C
- Холодильник на -20°C
- Холодильник на -70°C
- Наконечники с аэрозольным фильтром на 1-20, 20-200, и 200-1000 мкл
- Стерильные микроцентрифужные пробирки на 0,2, 0,5, 1,5, и 2 мл
- Резиновые перчатки
- Стерильная вода свободная от нуклеаз для ПЦР
- ДНК полимераза Taq Gold, 10X ПЦР буфер II и Mg Cl₂ (Applied Biosystems ref. n° N808-0245)
 - Смесь нуклеотидов, содержащая 10 мМ каждого из дНТФ (Roche Diagnostics ref. n° 11581295001)
 - Праймеры в концентрации 20 пмоль/мл
 -) последовательность праймера PPA-1 5'-AGTTATGGGAAACCCGACCC-3' (прямой)
 - последовательность праймера PPA-2 5'-CCCTGAATCGGAGCATCCT-3' (обратный)

3.2 МЕТОДОЛОГИЯ

А) АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК

А.1: Приготовление реакционной смеси:

- . В стерильную микропробирку объемом 1,5 мл поместите реакционную смесь, описанную ниже на необходимое количество образцов.
- : ПЦР смесь на одну пробу

<u>РЕАКТИВЫ</u>	ОБЪЕМ (на 25мл реакционной смеси)
10X буфер II	2,5 µl
Mg Cl ₂ (25мМ)	2 µl



ДНТФ (10 мМ)	0,5 µl
праймер РРА-1	0,25 µl
праймер РРА-2	0,25 µl
Полимераза Amplitaq Taq Gold (5 ед/мл)	0,125 µl
H ₂ O	17,37 µl

A.2. Добавьте по 23 мкл смеси в необходимое количество пробирок.

A.3. Добавьте 2 мкл матрицы ДНК в каждую пробирку. Поставьте положительный контроль (2 мкл ДНК) и отрицательный контроль (2 мкл дистиллированной воды).

A.4. Закройте пробирки и перемешайте их.

A.5: Поместите пробирки в автоматический амплификатор с нагреваемой крышкой. Запустите программу амплификации, описанную ниже.

. Активация Taq Gold ДНК полимеразы
95°C---10 мин.

Денатурация ДНК	95°C---15 сек	} 40 циклов
Отжиг праймеров	62°C---30 сек	
Элонгация ДНК	72°C---30 сек	

Финальная элонгация 72°C---7 мин.

Хранение на 4°C

В) ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

В.1 Взвесьте 2 г агарозы для приготовления 2% геля

В.2 Добавьте 2 г агарозы в 100 мл 1x ТАЕ буфера



- V.3** Нагревайте смесь в микроволновой печи до тех пор пока агароза полностью не расплавится.
- V.4** Добавьте 3 мкл SYBR safe (Invitrogen ref. nº. S33102-400 µl) на 100 мкл агарозного геля.
- V.5** Подготовьте мостик для геля и поместите туда необходимое количество гребенок. Вылейте расплавленную агарозу в мостик.
- V.6** Осторожно поместите мостик в камеру для электрофореза. Достаньте гребенки. Добавьте 1X TAE буфер, чтобы покрыть гель.
- V.7** Добавьте 2,5 мкл 10X красящего буфера в каждую пробирку.
- V.8** Поместите по 10 мкл каждого образца в лунку геля.
- V.9** Добавьте 10 мкл маркера молекулярного веса VI в одну из лунок каждого ряда геля.
- V.10** Подключите источник тока. Проводите электрофорез при постоянном напряжении 120-130 вольт в течение 30 мин. (образца ДНК будут двигаться к положительному электроду)
- V.11.** Для учета результатов поместите гель на У/Ф трансиллюминатор.

3.4 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Положительные образцы будут представлены в виде полосы на том же уровне, что и ПЦР продукт положительного контроля. Молекулярный маркер используется для того, чтобы посчитать молекулярный вес продукта. Данным методом амплифицируется продукт размером 257 п.о.

Реакция считается валидной, если оба контроля выделения и реакции дают отдельную полосу соответствующего размера, а оба отрицательных контроля не дают никаких полос.

