



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal



СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ (АЧС) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

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



1. ПРОБОПОДГОТОВКА

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 мл |

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

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.
- 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.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal

- 2.2.10 Удалить пробирку для сбора и поместить фильтровальную пробирку в чистую пробирку для сбора
- 2.2.11 Добавить 500 мл 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 В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

3.1 МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Стерильная H₂O свободная от нуклеаз, для ПЦР.
- QRT-PCR Master Mix 2X Brilliant II (Stratagene).
- Taq Man в концентрации 10 пкмоль/мкл:
5'-FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA -3'
- Праймеры в концентрации 20 пкмоль/мкл:
 - Праймер по **King-s** последовательность
 - 5'-STGCTCATGGTATCAATCTTATCGA -3' (Прямой)
 - Праймер по **King-a** последовательность
 - 5'-GATACCACAAGATCRGCCGT -3' (Обратный)



3.2 МЕТОДОЛОГИЯ:

3.2.1 ПОДГОТОВКА ПЦР СМЕСИ:

В стерильную 1.5 мл микроцентрифужную пробирку перенести компоненты ПЦР смеси представленные ниже в количестве соответствующем количеству образцов плюс один (включая положительные и отрицательные контроли реакции).

ПЦР смесь на один образец:

| <u>РЕАКТИВЫ</u> | ОБЪЕМ (25 µl реакция) |
|-----------------------------|----------------------------------|
| 2X PCR Master Mix | 12,5 µl |
| праймер King-s 20 µM | 0,5 µl |
| праймер King-a 20µM | 0,5 µl |
| TaqMan зонд 10µM | 0,63 µl |
| H₂O | 8,87 µl |

3.2.2 Добавить по 23 µl ПЦР смеси в подготовленные ПЦР-пробирки объемом 200 мкл.

3.2.3 Добавить 2 µl ДНК образца в каждую ПЦР пробирку.

- ❖ Включите в ПЦР положительный контроль (2 µl ДНК) и отрицательный контроль (2 µl дистиллированной воды) при каждой постановке ПЦР.

3.2.4 Закройте ПЦР пробирку и перемешайте содержимое.

3.2.5 Поместите пробирку в термоциклер . Запустите программу циклирования описанную ниже:

Активация ДНК-полимеразы.

95°C---3 мин.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal



| | | |
|---------------------------|---------------|-------------|
| ДНК денатурация | 95°C---10 сек | } 45 циклов |
| Отжиг праймеров/Элонгация | 58°C---30сек | |

Запрограммируйте детекцию флюоресцентного сигнала по каналу FAM в конце каждого цикла.

3.3 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

О правильном проведении этапов выделения ДНК и непосредственно ПЦР свидетельствуют значения положительного контроля Ct в пределах 32±2, и отсутствие значений Ct для отрицательного контроля.

В положительных образцах наблюдается сигмовидная кривая показывающая количество циклов амплификации относительно значения флюоресцентного сигнала, которое не должно превышать 40. В отрицательном образце флюоресцентный сигнал будет лежать ниже базовой линии и термоциклер не будет детектировать значение Ct

Значение Ct >38 для образцов при наличии сигмовидной формы кривой, может говорить о сомнительных пробах, в этом случае анализ должен быть повторен. При значении Ct >38 и линейной кривой, образец может считаться отрицательным.