

ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ	
Дата	02.02.09
Инициалы	158
Лист	8

Утверждаю  
Заместитель Руководителя  
Россельхознадзора

Н.А. Власов

«02» февраля 2009 г.

Инструкция  
по применению «Тест-системы для выявления  
генома вируса блютанга методом ПЦР»

(организация-производитель - ГНУ ВНИИВВиМ  
Россельхозакадемии, г. Покров, Владимирская обл.)

### 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Тест-система для выявления генома вируса блютанга методом полимеразной цепной реакции.

2. Тест-система предназначена для обнаружения генома вируса блютанга методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в образцах крови, пробах органов латентно инфицированных, больных и павших животных и/или в инфицированной культуре клеток (при выделении вируса в данной системе).

3. Состав тест-системы и условия хранения наборов:

- Набор № I - набор для выделения нуклеиновых кислот (на 50 образцов);
- Набор № II - набор для выявления генома вируса блютанга методом ПЦР (на 50 анализов);
- Набор № III - набор для проведения электрофореза (5 гелей по 10 образцов).

3.1. Набор для выделения нуклеиновых кислот состоит из следующих компонентов:

- раствор № 1, 25,0 см<sup>3</sup> - 1 флакон;
- раствор № 2, 20,0 см<sup>3</sup> - 1 флакон;
- раствор № 3, 30,0 см<sup>3</sup> - 1 флакон;
- буфер для элюции, 1,5 см<sup>3</sup> - 2 пробирки;
- отрицательный контрольный образец (ОК), 0,7 см<sup>3</sup> - 1 пробирка;
- сорбент 1,5 см<sup>3</sup> - 1 пробирка;
- положительный контрольный образец (ПК), 0,7 см<sup>3</sup> - 1 пробирка.

3.2. Набор для выявления генома вируса блютанга методом ПЦР состоит из следующих компонентов:

- фермент Taq- полимеразы, 7,0 мм<sup>3</sup> - 1 пробирка;
- фермент MMLV-ревертаза, 7,0 мм<sup>3</sup> - 1 пробирка;
- буфер для ОТ, 0,5 см<sup>3</sup> - 1 пробирка;
- праймеры ВБ-1 0,05 см<sup>3</sup> - 1 пробирка;
- праймеры ВБ-2 0,2 см<sup>3</sup> - 1 пробирка;

- буфер для ПЦР 0,2 см<sup>3</sup> - 1 пробирка;
- пробирки с воском - 50 штук.

3.3. Набор для проведения электрофореза состоит из следующих компонентов:

- агароза, 5,0 г - 1 флакон;
- 50-ти кратный ТАЕ буфер для электрофореза с бромидом этидия, 40,0 см<sup>3</sup> - 1 флакон;

4. Компоненты наборов расфасованы в стерильные пластиковые пробирки вместимостью 0,5 см<sup>3</sup> и 2,0 см<sup>3</sup> (производства «SSI», либо аналогичные) и стерильные стеклянные или пластиковые флаконы соответствующей вместимости (производства «Wheaton Science Products» либо аналогичные).

5. На пробирках (флаконах) с каждым компонентом должна быть наклеена этикетка с указанием краткого наименования компонента, количества препарата в пробирке, номера серии и даты изготовления.

6. Флаконы и пробирки должны быть упакованы в пластиковые пакеты с указанием: наименования организации-производителя и/или его товарного знака, наименования набора, перечня компонентов, входящих в набор, их количества и количества препарата в каждой пробирке (флаконе), номера серии и контроля, даты изготовления и срока годности, условий хранения.

7. На каждую коробку с тест-системой должна быть наклеена этикетка с указанием наименования организации-производителя и/или его товарного знака, названия тест-системы, номера серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения и номера СТО. В каждую коробку для тест-системы должна быть вложена инструкция по применению тест-системы.

8. Тест-систему хранят в организации-производителя и у потребителя: наборы № I и № III - при температуре от 2 °С до 8 °С в темном сухом месте, а ПҚ и набор № II - при температуре минус (20±2) °С.

9. Транспортирование тест-системы осуществляют в теплоизолирующей упаковке (термос или пенопластовая коробка с хладагентом) при температуре от 0 °С до 2 °С.

10. Компоненты тест-системы без этикеток, с нарушенной целостности укупорки флаконов или с истекшим сроком годности обеззараживают кипячением в течение 30 мин.

11. Срок годности составляет 6 месяцев со дня изготовления. Тест-систему по истечении срока годности не применяют.

## II. ПРИНЦИП МЕТОДА

12. Анализ по выявлению вируса блютанга включает: выделение РНК из проб органов или крови, постановку реакции обратной транскрипции для получения комплементарной ДНК (кДНК), амплификации специфического фрагмента в полимеразной цепной реакции и электрофорез в агарозном геле.

13. В основе ПЦР лежит многократное повторение циклов денатурации исследуемой кДНК при температуре 94°С, гибридизации ДНК со

специфическими праймерами при температуре 62°C и синтеза с них комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы при температуре 72°C. В результате амплификации концентрация синтезированного фрагмента в исследуемой пробе увеличивается в миллионы раз, что позволяет визуально учитывать результаты анализа с помощью электрофореза в агарозном геле.

14. Тест-система рассчитана на исследование 50 проб биологического материала, включая контроли. При точном соблюдении инструкции по применению анализ занимает от 2 до 6 часов (в зависимости от условий выделения и количества проб).

### III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

#### **15. Взятие и подготовка биологического материала для исследования**

15.1. Для исследования берут лимфатические узлы, селезёнку и кровь от 3-5 латентно инфицированных, больных или павших животных.

15.2. Пробы, массой 5-10 г каждая, отбирают в одноразовую пластиковую посуду. Кровь стерильно отбирают по 2-3 см<sup>3</sup>, используя одноразовые системы вакуумного отбора крови (типа «Vacuette») или одноразовые шприцы в стеклянные пробирки, в которые залит раствор антикоагулянта (ЭДТА, Трилон Б, Версен) в количестве 1/10 от объема крови отбираемой на исследование. После забора кровь тщательно перемешивают с антикоагулянтом в пробирке, для предотвращения образования сгустков.

15.3. Пластиковую посуду с пробами органом и/или пробирки с кровью, снаружи обрабатывают 5 %-ным раствором едкого натра или осветлённым 20 %-ным раствором хлорной извести, обёртывают марлей, смоченной тем же раствором, укладывают в полиэтиленовый пакет и помещают в термос со льдом. В случае длительной транспортировки (более 2 сут) пробы органов замораживают. Термос помещают в металлический контейнер, опечатывают и доставляют нарочным в лабораторию с сопроводительным документом.

15.4. В лаборатории пробы селезёнки и лимфатических узлов очищают от жировой и соединительной тканей. Готовят 20 %-ную суспензию, для чего навески каждого органа гомогенизируют в физиологическом растворе или в растворе № 1 «Набора для выделения нуклеиновых кислот».

15.5 Для проведения исследований, гомогенат органов, кровь или лизат культуры клеток в количестве 0,2 см<sup>3</sup> переносят в полипропиленовую пробирку на 1,5 см<sup>3</sup> и используют для анализа.

#### **16. Выделение РНК для анализа**

16.1. Выделение РНК из исследуемого биологического материала проводят с помощью Набора № I - Набора для выделения нуклеиновых кислот.

16.2. Во избежание перекрестной контаминации до начала работы маркируют чистые пробирки объемом 1,5 см<sup>3</sup> и вносят в них по 0,5 см<sup>3</sup> раствора №1. После этого приступают к работе с инфицированным материалом.

16.3. Образцы исследуемого биологического материала (в объеме 0,2 см<sup>3</sup>) добавляют в подготовленные пробирки, содержащие 0,5 см<sup>3</sup> раствора №1. В пробирку, предназначенную для отрицательного контрольного образца (ОК)

вносят 0,2 см<sup>3</sup> ОК. В пробирку, предназначенную для положительного контроля (ПК) вносят 1,0 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 0,2 см<sup>3</sup> ПК, содержимое перемешивают. После чего пробирки инкубируют 8 мин при комнатной температуре (20±2) °С, периодически плавно перемешивая.

16.4. Во все пробирки добавляют 40,0 мм<sup>3</sup> (мкл) сорбента (сорбент перед использованием необходимо тщательно ресуспендировать), инкубируют при комнатной температуре (20±2) °С в течение 6 мин, 1-2 раза перемешивая на смесителе типа «Vortex». Центрифугируют 10-15 сек на микроцентрифуге при 6000-13000 об/мин, надосадочную жидкость отбрасывают. К осадку добавляют 0,4 см<sup>3</sup> раствора №2, перемешивают в течении 8 мин, сорбент осаждают центрифугированием в течение 15 сек при 6000-13000 об/мин, надосадочную жидкость отбрасывают.

16.5. К осадку добавляют 0,6 см<sup>3</sup> раствора №3, перемешивают, центрифугируют 15 сек при 6000-13000 об/мин, надосадочную жидкость отбрасывают. Процедуру повторяют 2 раза.

16.6. Осадок подсушивают в течение 10 мин при 56 °С в пробирке с открытой крышкой.

16.7. К осадку добавляют 50,0 мм<sup>3</sup> (мкл) буфера для элонгии РНК с сорбента, перемешивают на смесителе типа «Vortex» и инкубируют в течение 5 мин при 56 °С, вновь перемешивают и центрифугируют в течение 0,5 мин при 13000 об/мин. Отобранную надосадочную жидкость используют для проведения ПЦР.

Не допускается многократное замораживание и размораживание выделенной РНК. Длительному хранению РНК не подлежит (хранят при температуре минус 40°-70°С не более 7 сут).

**ВНИМАНИЕ.** На всех стадиях обработки биоматериала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми пипетками при помощи вакуумного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3 % хлорамин и т. п.).

17. Проведение синтеза кДНК и полимеразной цепной реакции (ПЦР)

17.1. Для выполнения используют Набор № II - Набор для выявления генома вируса бляшанга методом ПЦР.

Синтез кДНК и ПЦР проводят в пробирках, вложенных в набор.

**17.2 Синтез кДНК.**

**ВАЖНО: Заморозить песок или ПЦР-охладитель типа IsoTerm-System на 1,5 часа при минус 40°-70°С!**

Предварительно включить амплификатор с программой:

88°С	пауза	
88 °С	- 10 мин	1 цикл

Режим точный. Объем смеси 45 мкл.

Оставить на паузе.

Подготавливают и подписывают пробирки из набора для N-количества образцов, в число которых входят анализируемые пробы а контроли выделения. В пробирки на воск вносят 9,0 мм<sup>3</sup> (мкл) исследуемой РНК.

Поставить пробы во включенный амплификатор и продолжить программу.

**ВАЖНО: За 2-3 мин до окончания программы пробирки вынуть из амплификатора, быстро погрузить их в охлажденный до минус 40°-70°С песок/ПЦР-охладитель и поместить песок/ПЦР-охладитель с пробирками в морозильник на минус 40°-70°С, пока будет готовиться реакционная смесь! Пробы должны замерзнуть!**

50 °С                      Пауза  
50 °С                      - 30 мин                      1 цикл

Режим точный. Объем реакционной смеси 50 мкл.

Оставить на паузе.

В отдельной пробирке готовят общую реакционную смесь на N-количество образцов, в число которых входят контроли ОК и ПК.

Реактивы вносят в последовательности, приведенной в таблице.

Реактив	Кол-во на 1 пробу	К-во на N проб (мкл)
Буфер для ОТ	9	9 x (N+1)
Праймеры ВБ-1	1	1 x (N+1)
Фермент MMLV ревертаза	0,1	0,1 x (N+1)

Реакционную собранную смесь перемешивают, избегая образования пены, и немедленно вносят, отдельными накопечниками, по 10 мм<sup>3</sup> (мкл) в пробирки, находящиеся в песке/ПЦР-охладителе.

Пробы вносят в амплификатор и нажимают «продолжить программу».

Песок или хладоагент снова убрать в соответствующий морозильник.

**ВАЖНО: За 3-5 мин до окончания программы вынуть пробирки из амплификатора, быстро погрузить их в охлажденный до минус 40°-70°С песок/ПЦР-охладитель и поместить песок/ПЦР-охладитель с пробирками в морозильник на минус 40°-70°С, пока будет готовиться реакционная смесь! Пробы должны замерзнуть!**

### **17.3. Проведение ПЦР**

Предварительно включить амплификатор с программой:

94 °С	пауза	
94 °С	- 1 мин	1 цикл
94 °С	- 15 сек	
62 °С	- 15 сек	42 цикла
72 °С	- 15 сек	
72 °С	- 1 мин	1 цикл

Режим точный. Объем реакционной смеси 65 мкл.

Оставить на паузе.

В отдельной пробирке готовят общую реакционную смесь на N- количество образцов, в число которых входят контроли ОК и ПК. Реактивы вносят в последовательности, приведенной в таблице. Фермент добавляют в последнюю очередь.

Реактивы	Кол-во на 1 пробу (мкл)	К-во на N проб (мкл)
Праймеры ВБ-2	4	4 x (N+1)
Буфер для ПЦР	4	4 x (N+1)
Фермент Таq-полимераза	0,1	0,1 x (N+1)

Смесь перемешивают, избегая образования пены и немедленно вносят по 8 мм<sup>3</sup> (мкл) в те же пробирки, которые после синтеза погружены в охлажденный песок или ПЦР-охладитель.

Пробы быстро помещают в предварительно включенный амплификатор и продолжают программу.

### **18. Учет результатов амплификации**

18.1. Результаты исследования учитываются путем анализа продуктов амплификации исследуемых образцов методом электрофореза в агарозном геле с использованием Набора № III - Набора для проведения электрофореза.

#### **18.2. Приготовление буфера для электрофореза**

Для приготовления 500,0 см<sup>3</sup> рабочего буфера для электрофореза к 40,0 см<sup>3</sup> исходного буфера с бромидом этидия добавить 460,0 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

#### **18.3. Приготовление агарозного геля**

К 100,0 см<sup>3</sup> буфера для электрофореза добавляют 2,0 г агарозы, доводят до кипения в СВЧ-печи, охлаждают до 50-55 °С и заливают в специальную форму с гребенкой, и дают затвердеть. Форму с агарозой переносят в аппарат

для горизонтального электрофореза, погружают в буфер и осторожно вынимают гребенку.

#### **18.4. Электрофорез продуктов амплификации**

10,0 мм<sup>3</sup> (мкл) ПЦР-продукта вносят в лунки агарозного геля, образовавшиеся от зубцов гребенки.

18.5. Электрофорез проводят при напряжении 8 вольт/см длины геля в течение 15-20 мин. Направление движения образцов в геле от «-» к «+»!

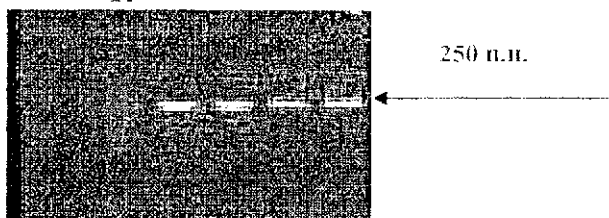
#### **18.6. Учет результатов электрофореза**

Результаты электрофореза просматривают в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Результаты реакции выявляются в виде светящихся красноватых полос.

18.7. Положительными считают пробы, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полоса положительного контроля. Размер ПЦР-продукта должен составлять 250 п.н.

Исследуемые пробы считают отрицательными, если в них не выявлено никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольной пробе (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта).

К-



В отрицательном контроле не должно выявляться никаких полос. Присутствие в отрицательном контроле окрашенных фрагментов на уровне полос положительного контроля свидетельствует о перекрестной контаминации в процессе анализа. В этом случае результаты не учитываются, а анализ необходимо провести заново.

18.8. Для документирования полученных результатов возможно использование любой системы гель-документирования (например ViTran, «Биоком»), либо другие фото- и видеосистемы.

#### **19. Необходимые условия успешного проведения анализа**

19.1. Строгое соблюдение условий хранения компонентов тест-системы.

19.2. Разовое (однократное) использование наконечников и пробирок. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя!

19.3. Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромпиком и отмыта.

19.4. Пробирки с вирусным материалом должны быть всегда закрытыми. При отборе вирусосодержащих суспензий работать наконечником с фильтром.

19.5. Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышке осадить центрифугированием. При открывании и закрывании пробирок избегать случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

#### IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

20. При работе с компонентами тест-системы следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с ветеринарными препаратами.

21. Все работы необходимо проводить с обязательным использованием средств индивидуальной защиты.

22. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

23. Тест-систему следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии. Юридический и почтовый адрес - 601120, Владимирская область, г. Покров.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ.

Регистрационный номер ПВР-1-8.8/02316

