

## МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ ПЛР

Усі маніпуляції здійснюються у спеціально облаштованих лабораторних приміщеннях, у спецодязі, і **ОБОВ'ЯЗКОВО** у гумових рукавичках.

### 1. Виділити ДНК з проб

1.1. Чисті поліпропіленові пробірки типу Епендорф об'ємом 1,5 мл пронумерувати і розташувати відповідним чином в штативі. Занотувати у протокол.

1.2. Згідно з обраною відповідною оптимальною методикою провести виділення ДНК. (**вставка** кітовий набір, м-д теплового лізису)

1.3. Розчин очищеної ДНК можна зберігати при -18 ...-20°C протягом двох тижнів.

### 2. Провести ПЛР (ампліфікація)

2.1. Підготувати і пронумерувати пробірки для проведення ампліфікації місткістю 0,5 мл (або 0,2 мл) відповідно до кількості аналізованих проб на наявність ДНК збудника. Підготувати та промаркувати пробірки для позитивного (маркування «К+») і негативного (маркування «К-») контрольних зразків.

2.2. Приблизно за 30 хвилин до приготування робочої ампліфікаційної суміші розморозити реагенти для ПЛР на крижаній бані при кімнатній температурі.

2.3. Внести в пробірки у необхідній кількості реагенти для ампліфікації з розрахунку на кінцевий об'єм суміші 20 мкл. (**Вставка** підбираються емпірично для мах кількості ампліконів заданої довжини, щоб уникнути неспецифічних продуктів)

При приготуванні реакційної суміші необхідно усі компоненти додавати окремими накінечниками.

-ДН<sub>2</sub>О

-10хПЛР буфер

-2 мМ дезоксінуклеозидтрифосфати дНТФ

- кожен із пари 10мМ праймерів

- 50 мМ Mg<sup>2+</sup>

- Taq-полімераза 50 г/мл (2 Од.)

2.4. Після додавання Taq-полімерази, яке додається в останню чергу, необхідно ретельно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі (3-5 с).

2.5. Внести 5 мкл зразка (ДНК з обробленої аналізованої проби) у відповідну пробірку. Перемішати.

2.6. Внести в пробірки для позитивних контрольних зразків по 5 мкл відповідного позитивного контрольного зразка ДНК, а в пробірку для негативного контрольного зразка – усі компоненти реакційної суміші, крім ДНК.

2.7. Нашарувати в усі пробірки по 1 краплі (близько 25-30 мкл) мінерального масла.

2.8. Пробірки закрити і перенести в програмований термостат (ампліфікатор).

2.9. Завдати відповідну програму на 35-ть циклів. (Вставка залежно від ланцюга відпал праймера до 10 хвилин, останній етап 7-10 хвилин)

306 пн IS1081

1 хв 94°C (1-й цикл 4 хв) denaturation

1,5 хв 68°C annealing

2хв 72°C (35-й цикл 10 хв) extension

∞ 4°C

BW -6 (5` CGA CAC CGA GCA GCT TCT GGC TG 3`)

BW -7 (5` GTC GGC ACC ACG CTG GCT AGT G 3`)

### 3. Здійснити детекцію продуктів ПЛР

Розділення продуктів ампліфікації методом горизонтального електрофорезу.

3.1. Залити в апарат для електрофорезу ТАЄ буфер, приготований на дистильованій воді разбавленням 50хТАЄ в 50 разів. (вставка з бромистим етидієм або без нього)

3.2. До 2,0 г агарози додати 2 мл 50х ТАЄ буфера і 100 мл дистильованої води.

3.3. Приготовану суміш розплавити. Додати до 100 мл розплавленої агарози 10 мкл 1% розчину бромистого етидію. Перемішати. (вставка з бромистим етидієм або без нього)

3.4. Охолодити розплавлену агарозу до температури 50-60°C і залити в планшет для заливки гелю. Для отримання в агарозному гелі кишень для нанесення зразків встановити на планшет гребінку. Після застигання агарози обережно виїняти гребінку з гелю і перенести планшет з гелем в камеру для проведення електрофорезу.

3.5. Нанести в проби барвник.

3.6. Нанести в кишені гелю по 10-15 мкл ампліфіката в послідовності відповідної нумерації проб. Нанести позитивні і негативні контролю та маркер молекулярної ваги. Занотувати схему.

3.7. Підключити електрофоретичну камеру до джерела живлення і задати напругу, відповідну напруженості електричного поля 10-15 В / 1 см<sup>2</sup> гелю. Провести електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації в напрямку від катода (-) до анода (+). Контроль за електрофоретичним розділенням здійснюється візуально по руху смуги барвника. Смуга барвника повинна пройти від старту 1,5-2см.

3.8. Для візуалізації результатів електрофорезу виїняти гель з форми і перенести його на скло УФ-трансліюмінатора.

УВАГА! З гелем агарози слід працювати в нітрилових рукавичках. Бромистий етидій є сильним мутагеном.

3.9. Включити трансліюмінатор і проаналізувати результати аналізу. Фрагменти аналізованої ДНК проявляються у вигляді світних оранжево-червоних смуг при опроміненні УФ-випромінюванням з довжиною хвилі 310 нм.

**(Вставка** Облік за наявністю або відсутністю ампліконів заданого розміру.

-відсутність смуги оранжево-червоного кольору строго на рівні позитивного контролю (ПК) свідчить про відсутність ДНК шуканого збудника в аналізованій пробі;

-наявність смуги, відповідної по електрофоретичній рухливості позитивному контролю - про присутність ДНК шуканого збудника)

## PCR

All manipulations are carried out in a specially equipped laboratory (in a laminar flow cabinet equipped with an UV lamp), in medical overalls, and be sure to wear gloves.

### 1. DNA isolation

- 1.1. Number and position properly in the rack clean polypropylene Eppendorf tubes 1.5 ml. Fix in the protocol.
- 1.2. According to the corresponding optimal method chosen to isolate DNA carry out an extraction. (kit, heat lysis)
- 1.3. A solution of the purified DNA can be stored at -18 ...- 20 ° C for two weeks.

### 2. PCR performance (amplification)

- 2.1. Prepare and number thin-walled tubes for amplification (0.5 ml or 0.2 ml) according to the number of samples analyzed for pathogen DNA presence of. Prepare and label the tubes for the positive (marked "C+") and negative (marked "C-", "no template control") controls.
- 2.2. Approximately 30 minutes before the preparation of the working amplification PCR mixture thaw reagents on an ice bath at room temperature.
- 2.3. Add to tubes necessary amounts of amplification reagents to the final volume of 20  $\mu$ l. (determined empirically for max number of amplicons of predetermined length, to avoid non-specific products)  
While the preparation of the reaction mixture, it is necessary to add all the components with individual tips.
  - DH<sub>2</sub>O
  - 10xPCR buffer
  - 2 MM deoxynucleoside triphosphate dNTPs
  - 10 mM of each pair of primers
  - 50 mM Mg<sup>2+</sup>
  - Taq-polymerase, 50 g/ml (2 AU)
- 2.4. After the addition of Taq-polymerase, which is added the last, the mixture must be stirred thoroughly by pipetting or vortexing (3-5 s).
- 2.5. Add 5  $\mu$ l of the sample DNA to the appropriate tube. Mix.
- 2.6. Add 5  $\mu$ l of the corresponding positive control DNA sample to tubes for positive control samples, and all reaction components except DNA to the test tube for the negative control sample.
- 2.7. When using a thermal cycler that does not contain a heated lid, overlay the reaction mixture in all tubes with 1 drop (about 25-30 L) of mineral oil.
- 2.8. Close the tubes and move them to a thermal cycler.

2.9. Apply the appropriate program on the 35-40 cycles. (depending on the primer chain annealing can take up to 10 minutes, the last stage about 7-10 minutes) 306 bp IS1081

1 min 94 ° C (1st cycle of 4 min) denaturation

1.5 min, 68 ° C annealing

2min 72 ° C (the 35th cycle of 10 min) extension

4 ° C ∞

BW- 6 (5` CGA CAC CGA GCA GCT TCT GGC TG 3`)

BW -7 (5` GTC GGC ACC ACG CTG GCT AGT G 3`)

### 3. The detection of PCR products

Separation of the amplification products by horizontal electrophoresis.

3.1. Fill the electrophoresis camera with 1xTAE buffer, prepared in distilled water by diluting 50xTAE 50 times.

3.2. Add 2.0 g of agarose to 2 ml of 50x TAE buffer and 100 ml of distilled water.

3.3. Melt the obtained mixture. Add 10  $\mu$ l of a 1% ethidium bromide solution to 100 ml of agarose. Mix.

3.4. Cool the agarose to a temperature of 50-60 °C and pour into a gel casting. For agarose gel samples pockets set the comb. After solidification of the agarose carefully remove the comb from the gel and transferee gel to the electrophoresis chamber.

3.5. Add dye to the samples.

3.6. Add 10-15  $\mu$ l of samples to the gel in accordance with the protocol. Add positive and negative controls and molecular weight marker. Fix the scheme.

3.7. Connect the electrophoresis chamber to the power supply and set the voltage corresponding to the electric field of 10-15 V/1 cm<sup>2</sup> of gel. Perform electrophoretic separation of the amplification products in the direction from the cathode (-) to the anode (+). Control of the electrophoretic separation is carried out visually by the movement of the dye band. Band dye must pass from the start 1,5-2 sm.

3.8. To visualize the results of the electrophoresis transfer gel to the UV glass transilluminator.

**WARNING!** Agarose gel should be contact with only in nitrile gloves. Ethidium bromide is a potential mutagen.

3.9. Analyze the results of the analysis. DNA fragments analyzed appear as red-orange luminescent bands upon irradiation with UV radiation with a wavelength of 310 nm.

(Accounting to the presence or absence of amplicons of the given size).

- the absence of orange-red color stripes strictly at the level of the positive control (PC) indicates the absence of the pathogen DNA in the sample;

-presence of the band corresponding to the electrophoretic mobility of the positive control indicates the presence of the pathogen DNA.