

**Набор реагентов для выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины  
методом полимеразной цепной реакции в реальном времени  
«*Candidatus Phytoplasma solani*-PB»**

**ИНСТРУКЦИЯ по применению**

## 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

### 1.1 Полное название

Набор реагентов для выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ».

### 1.2 Область применения

Набор реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ», предназначен для обнаружения ДНК *Candidatus Phytoplasma solani*.

Набор может быть использован в лабораторных центрах и институтах, проводящих контроль фитосанитарного состояния растений, в том числе посадочного материала в целях обнаружения ДНК *Candidatus Phytoplasma solani*. Набор позволяет качественно определить, содержится ли в образце ДНК *Candidatus Phytoplasma solani*.

Диагностика растений винограда с помощью набора «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ» возможна на всех этапах его вегетационного развития методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ» не требует технического обслуживания и калибровки.

### 2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 4 компонентов.

| № | Состав комплекта                                                                                                         | Описание                                    | Объем   | Кол-во     |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|------------|
| 1 | Реакционная смесь « <i>Ph.solani</i> -ВПК»                                                                               | Прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета | 1,10 мл | 2 пробирки |
| 2 | SynTaq ДНК-полимераза T+, 5 ед/мкл                                                                                       | прозрачная бесцветная жидкость              | 0,05 мл | 1 пробирка |
| 3 | Положительный контрольный образец, содержащий фрагмент ДНК <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ПКО « <i>Ph.solani</i> » | прозрачная бесцветная жидкость              | 0,10 мл | 1 пробирка |
| 4 | Отрицательный контрольный образец, ОКО                                                                                   | прозрачная бесцветная жидкость              | 0,20 мл | 1 пробирка |

### 2.2 Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение 100 реакций, включая контрольные образцы.

### 2.3 Принцип метода.

Обнаружение специфических фрагментов ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* основано на использовании метода мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени – ПЦР-РВ.

В основе метода ПЦР-РВ лежит изменение сигнала флуоресценции в ходе реакции. Это изменение происходит благодаря использованию специфического для искомой ДНК олигонуклеотидного зонда, который, подобно праймеру, в ходе реакции связывается с одной из цепей ампликона. К 5' и 3' концам зонда присоединены флуорофор и гаситель флуоресценции соответственно. При возбуждении молекулы флуорофора светом определенной длины волны данная молекула испускает свет другой длины волны. За счет близости молекул флуорофора и гасителя флуоресценции, находящихся на одном зонде, последний поглощает флуоресценцию, и изменения аналитического сигнала не происходит. В результате расщепления специфического для искомой ДНК олигонуклеотидного зонда Taq-полимеразой на этапе элонгации при температурах около 60°C, гаситель

прекращает поглощать флуоресценцию данной молекулы флуорофора (технология TaqMan). С каждым циклом ПЦР число освобожденных молекул флуорофора экспоненциально возрастает (рисунок 1).

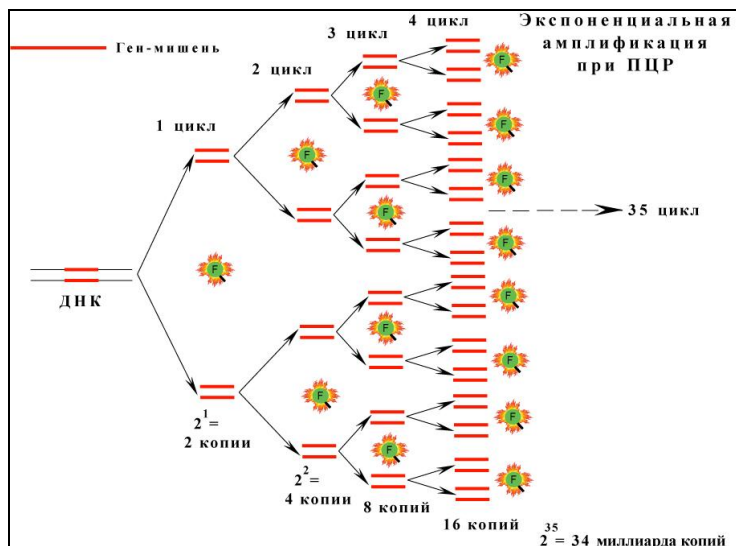


Рисунок 1 – Принцип аналитического процесса

Постановка ПЦР-РВ осуществляется в специальных приборах - амплификаторах, например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), «CFX-96» («BioRad», США), «Rotor Gene» (Qiagen), «DT» («ДНК-технология», Россия), QuantStudio5 (Thermofisher, США) или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

При амплификации методом ПЦР-РВ в наборе используются два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих специфический фрагмент ДНК *Candidatus Phytoplasma solani*, и два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих ДНК внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ, а также два флуоресцентных зонда. Процесс амплификации специфических фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени.

Набор реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ» позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси специфичный для *Candidatus Phytoplasma solani* фрагмент гена *SecY* – по каналу флуоресценции **FAM/Green**, а также внутренний положительный контроль – по каналу флуоресценции **R6G/HEX/Yellow/VIC**.

Праймеры, применяемые в данной системе, сконструированы таким образом, чтобы обнаруживать 100% всех штаммов целевого объекта последовательности которых находились в базе данных NCBI Nucleotide на 16.01.2019 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Вторая реакция – ВПК (Внутреннего Положительного Контроля) – необходима для исключения ложноотрицательных результатов.

## 2.4 Ограничения метода

В исследуемом материале ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения ДНК.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения НК либо проведения реакции ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР-РВ (п. 7.5 настоящей инструкции).

### 3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 3.1 Чувствительность

Чувствительность ПЦР при использовании набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani*-PB» не более  $3,0 \cdot 10^3$  копий ДНК в миллилитре пробы.

#### 3.2 Специфичность

Ложноотрицательные результаты при анализе образцов растений, содержащих ДНК целевого объекта *Candidatus Phytoplasma solani* отсутствовали. Ложноположительные результаты при анализе заведомо отрицательных образцов ДНК близкородственных объектов, а именно *Candidatus Phytoplasma vitis*, *Candidatus Phytoplasma rubi*, *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri* не выявлены.

### 4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

#### 4.1 Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским, биологическим (ветеринарным) или агрономическим образованием, получившего дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

#### 4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

Спецификации по безопасности предоставляются по запросу.

#### 4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

#### 4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

### 5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

#### 5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-PB – зарегистрированный в РФ и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM/Green, R6G/HEX/Yellow/VIC, ROX/Orange, Cy5/Red (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками –  $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}}$  (№1 – 485нм/520нм, №2 – 530нм/560нм, №3 – 580нм/620нм, №4 – 630нм/670нм), например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96».

#### 5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

#### 5.3 Дозирующие устройства

- Автоматический (механический) дозатор переменного объема на 10-100 мкл;
  - Автоматический (механический) дозатор переменного объема на 100-1000 мкл;
  - Автоматический (механический) дозатор переменного объема на 2-20 мкл;
- штатив для данных дозаторов.

#### 5.4 Другое используемое оборудование

- Микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901»);
- микроцентрифуга для микропробирок (стрипов) 0,2 мл (например, «Циклотемп-903»);
- штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;

штатив для микропробирок 0,2 мл (например, «РМ-2х48х0,2» (Синтол);  
холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов).

### 5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

### 5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером;  
микропробирки (стрипы) 0,2 мл с прозрачной крышкой для ПЦР-РВ;  
набор реагентов для выделения НК;  
отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;  
комплект средств для обработки рабочего места;  
одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;  
комплект средств для обработки рабочего места.

## 6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

### 6.1 Отбор и транспортировка образцов

Отбор образцов, транспортировку и хранение проводят в соответствии с ГОСТ 31783-2012 «Посадочный материал винограда (саженцы)», ГОСТ Р 53050-2008 «Материал для размножения винограда (черенки, побеги), ГОСТ 28182-89 «Саженцы винограда. Технические условия».

### 6.2 Выделение НК

Выделение ДНК проводят сорбентным методом (например, «ЦитоСорб», «Сорб-ГМО-А» («Синтол», Россия) или другими утвержденными методами (Doyle JJ, Doyle JL, 1990). Для определения возможной контаминации на этапе выделения НК в каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом включают отрицательный контроль выделения (**ОКО-В**), который анализируют далее в ПЦР-РВ.

Раствор ДНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°С в течение года.

## 7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1 Подготовка к проведению ПЦР-РВ

- Разморозить необходимое количество пробирок с реакционной смесью «**Ph.solani-ВПК**» (каждая пробирка рассчитана на постановку 50 реакций), выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель.
- В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать:  
**21\*(N+2) мкл** реакционной смеси «**Ph.solani-ВПК**»  
**0,5\*(N+2) мкл SynTaq** (ДНК-полимераза),  
где **N** – количество исследуемых образцов, включая **ОКО-В**, **2** – количество контролей (**ПКО**, **ОКО**).

*Примечание.* Отрицательные контроли выделения (**ОКО-В**) анализируют как исследуемые образцы, сохраняя при ПЦР-РВ порядок образцов и **ОКО-В**, который был при выделении НК.

Для удобства расчета воспользуйтесь таблицей.

|        |      |     |      |     |      |     |      |     |      |      |      |      |
|--------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|------|------|------|
| N      | 1    | 2   | 3    | 4   | 5    | 6   | 7    | 8   | 9    | 10   | 11   | 12   |
| PC     | 63   | 84  | 105  | 126 | 147  | 168 | 189  | 210 | 231  | 252  | 273  | 294  |
| SynTaq | 1,5  | 2   | 2,5  | 3   | 3,5  | 4   | 4,5  | 5   | 5,5  | 6    | 6,5  | 7    |
| N      | 13   | 14  | 15   | 16  | 17   | 18  | 19   | 20  | 21   | 22   | 23   | 24   |
| PC     | 315  | 336 | 357  | 378 | 399  | 420 | 441  | 462 | 483  | 504  | 525  | 546  |
| SynTaq | 7,5  | 8   | 8,5  | 9   | 9,5  | 10  | 10,5 | 11  | 11,5 | 12   | 12,5 | 13   |
| N      | 25   | 26  | 27   | 28  | 29   | 30  | 31   | 32  | 33   | 34   | 35   | 36   |
| PC     | 567  | 588 | 609  | 630 | 651  | 672 | 693  | 714 | 735  | 756  | 777  | 798  |
| SynTaq | 13,5 | 14  | 14,5 | 15  | 15,5 | 16  | 16,5 | 17  | 17,5 | 18   | 18,5 | 19   |
| N      | 37   | 38  | 39   | 40  | 41   | 42  | 43   | 44  | 45   | 46   | 47   | 48   |
| PC     | 819  | 840 | 861  | 882 | 903  | 924 | 945  | 966 | 987  | 1008 | 1029 | 1050 |
| SynTaq | 19,5 | 20  | 20,5 | 21  | 21,5 | 22  | 22,5 | 23  | 23,5 | 24   | 24,5 | 25   |

Полученную смесь перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать в течение нескольких секунд. Разлить полученную смесь по 20 мкл в пробирки на 0,2 мл.

3. **ПКО, ОКО** и исследуемые образцы разморозить, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать.

*Примечание.* Если образец ДНК содержит сорбент (магнитный сорбент), необходимо центрифугировать образцы 1 минуту при 10-14 тыс. об/мин. для полного осаждения сорбента. При использовании магнитного сорбента пробирки с ДНК после центрифугирования установить в магнитный штатив и добавление образцов производить, не вынимая пробирки из штатива.

Внести в подготовленные 0,2 мл пробирки по 5 мкл **ОКО**, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, **ПКО** (см. п. 5), используя наконечники с аэрозольным барьером, плотно закрыть крышки, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать пробирки для сброса капель.

4. Поместить пробирки в амплификатор в рекомендуемом порядке:

| № ячейки | Образец                |
|----------|------------------------|
| <b>1</b> | <b>ПКО «Ph.solani»</b> |
| <b>2</b> | <b>ОКО</b>             |
| 3        | исследуемый образец 1  |
| 4        | исследуемый образец 2  |
| ...      | ...                    |

## 7.2 Проведение ПЦР-РВ

### 7.2.1 Проведение ПЦР-РВ для приборов *RotorGene 6000/RotorGene Q*

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «Rotor-Gene».
3. В окне «**New Run / Новый тест**» выбрать вкладку «**Advanced / Детальный мастер**», затем опцию «**Empty Run / Пустой шаблон**» и нажать «**New / Новый**».
4. В открывшемся окне выбрать тип ротора «**36-Well Rotor / 36-луночный ротор**» и поставить галочку в окне «**Locking Ring Attached / Кольцо закреплено**», нажать «**Next / Далее**».
5. В открывшемся окне установить «**Reaction Volume / Объем реакции**» 25 мкл, убрать галочку «**15 µL oil layer volume / Объем масла / воска**» и нажать «**Next / Далее**».
6. В открывшемся окне нажать кнопку «**Edit Profile / Редактор профиля**», нажать «**New / Новый**» и выбрать «**Cycling (default) / Циклирование (по умолч.)**». Задать программу амплификации со следующими параметрами:

| Шаг     | Темп., °C | Время   | Детекция     | Красители                              | Повторов |
|---------|-----------|---------|--------------|----------------------------------------|----------|
| 1       | 94        | 3 mins  | No acquiring |                                        | 1        |
| Cycling | 94        | 15 secs | No acquiring |                                        | 50       |
|         | 60        | 40 secs | Acquiring    | <b>FAM/Green</b><br><b>JOE/ Yellow</b> |          |

7. В окне «**Edit Profile / Редактор профиля**» нажать кнопку «**OK**».
8. Установить чувствительность прибора в области настроек «**Chanel Setup / Установка канала**», используя клавишу «**Edit Gain / Уровень сигнала**»:

**Green** – 5

**Yellow** – 6

*Примечание:* при возникновении проблем (связанных с особенностью работы прибора, а именно с установленным оптимальным диапазоном уровня усиления сигнала флуоресценции по целевым каналам) необходимо при последующих запусках прибора для ПЦР-РВ RotorGene

**6000/RotorGene Q на этапе 8 пункта 7.2.1 провести автоматическую оптимизацию уровней сигнала согласно следующей инструкции:**

В окне «**New Run Wizard / Мастер нового теста**» нажать «**Gain Optimization / Оптимизация уровня сигнала**».

В открывшемся окне найти и нажать на вкладку «**Channel Settings / Установки каналов**».

В появившемся списке каналов выбрать «**All Channels / Все каналы**» и нажать «**Add / Добавить**».

В появившемся окне «**Auto-Gain Optimization Channel Settings / Установки Авто-оптимизации уровня сигнала**» нажать «**ОК/ДА**» для каждого канала.

После закрытия окна «**Auto-Gain Optimization Channel Settings / Установки Авто-оптимизации уровня сигнала**» поставить галочку «**Perform Optimization Before 1 st Acquisition / Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**» и нажать «**Close / Закрыть**».

9. Нажать клавишу «**Next / Далее**».
10. Запустить амплификацию кнопкой **Start run / Старт**.
11. В появившемся после начала работы прибора окне со сведениями об образцах внести названия образцов, в столбце «**Type / Тип**» указать «**Unknown / Образец**» для образцов, «**Positive / Положительный**» для ПКО и «**Negative / Отрицательный**» для ОКО. Нажать клавишу «**Finish / Закончить**».
12. По завершении ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

### **7.2.2 Проведение ПЦР-РВ для прибора CFX96**

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «**Bio-Rad CFX Manager**».
3. В меню **File** выбрать **New→Protocol**. В появившемся окне задать циклограмму со следующими параметрами:  
Sample Volume 25 µl
  1. 95,0 C for 5:00
  2. 95,0 C for 0:15
  3. 60,0 C for 0:40  
+Plate read4. GOTO 2, 49  
END  
Нажать **ОК** и сохранить протокол на компьютере в удобной рабочей папке.
4. Внести сведения об образцах и красителях. Для этого во вкладке **Plate** выбрать опцию **Create New**.
5. Нажать кнопку **Select Fluorophores**. В появившемся окне выбрать красители **FAM**, **HEX**. Нажать **ОК**.
6. Обозначить на плашке месторасположение образцов:
  - Первая лунка – **ПКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ПКО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Positive Control**.
  - Вторая лунка – **ОКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ОКО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Negative Control**.

- Следующая лунка - исследуемый образец 1, затем – исследуемый образец 2 и т.д. в соответствии с п. **Порядок следования образцов**. Для этого выделить все оставшиеся лунки, в которых находятся пробирки с образцами, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Unknown**.
7. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям. Для этого выделить на плашке лунки со всеми исследуемыми пробирками (включая ПКО и ОКО) и поставить галочки в колонке **Load** напротив названий всех выбранных в п.5 красителей.
  8. Задать названия всех исследуемых образцов. Для этого выделить лунки, в которых находятся пробирки с обозначаемым образцом. В графе **Sample Name** ввести (или выбрать из уже имеющихся) имя соответствующего образца. Затем поставить галочку в соседней графе **Load**. Повторить то же самое для оставшихся образцов.
  9. Нажать **ОК**. Дать имя плашке с указанием даты эксперимента и сохранить полученный файл на компьютере в удобной рабочей папке.
  10. Начать работу прибора. Для этого выбрать закладку **Start Run**, в которой нажать клавишу **Start Run**. Задать имя будущего файла с указанием даты проведения эксперимента. Сохранить файл на компьютере в удобной рабочей папке.
  11. Зафиксировать в рабочем журнале название файла.
  12. По завершении ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

### 7.2.3 Проведение ПЦР-РВ для приборов АНК-32 (32М, 48).

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу **ANK Shell**.
3. Выбрать вкладку «**Быстрый старт**». В появившемся окне выбрать красители **FAM**, **R6G**. Задать имя будущего файла, а также выбрать тип прибора (32 пробирки или 48 пробирок).
4. В окне «**Амплификатор**» задать программу амплификации.

| Тип              | Температура, Т, С | Время, t, сек. | Наблюдение | Расчет   |
|------------------|-------------------|----------------|------------|----------|
| Изотерма         |                   |                |            |          |
| 1                | 95                | 300            | Включено   |          |
| Циклограмма (50) |                   |                |            |          |
| 1                | 95                | 15             | Включено   |          |
| 2                | 60                | 40             | Включено   | Включено |

5. Во вкладке «**Образцы**» внести описание исследуемых образцов и расставить образцы по планшету.
6. Занести в рабочий журнал название файла данных, соответствующее исследованию.
7. Для запуска исследования нажать **Старт**.
8. По завершении ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

### 7.2.4. Проведение ПЦР-РВ для приборов Dtprime / Dtlite.

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «**RealTime\_PCR**».

3. Перед проведением амплификации необходимо заполнить протокол исследования (вкладка «**Протокол**»). В каждой строке необходимо отредактировать следующие данные:
  - № (номер пробирки)
  - R (добавление дублей)
  - тип пробирки (образец, положительный контроль, отрицательный контроль и т.д.)
  - флуорофоры (**FAM** – специфика, **HEX** – ВПК.)
4. После заполнения таблицы с данными о пробирках необходимо указать расположение пробирок в блоке амплификатора. Расположение пробирок в блоке амплификатора схематично отображается в правой нижней части окна.
5. Запуск программы амплификации осуществляется во вкладке «**Запуск программы амплификации**».
6. Перед запуском необходимо выбрать заранее созданную **программу амплификации**, отредактировать объём рабочей смеси в пробирке (25 мкл).

Параметры амплификации:

| Цикл | Повторы | Шаг | Время | Температура | Детекция |
|------|---------|-----|-------|-------------|----------|
| 1    | 1       | 1   | 05:00 | 95,0        |          |
| 2    | 50      | 1   | 00:15 | 95,0        |          |
|      |         | 2   | 00:40 | 60,0        | Включена |

7. Нажать кнопку «**Запустить программу**».

По завершении ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

### 7.2.5 Проведение ПЦР-РВ для прибора QuantStudio5.

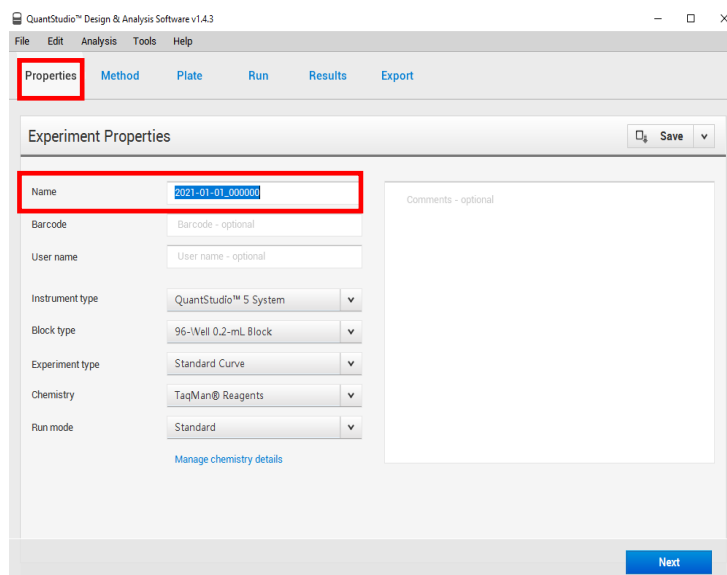
1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «**QuantStudio Designs & Analysis Software**».
3. Нажать кнопку **Открыть эксперимент (Open Existing Experiment)**. В открывшемся окне выбрать протокол «**Phyto\_DNA**» и нажать кнопку **Открыть (Open)**.

**Примечание:** Порядок самостоятельного создания протокола «Phyto\_DNA»

*А. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.*

*Б. Запустить программу «**QuantStudio Designs & Analysis Software**».*

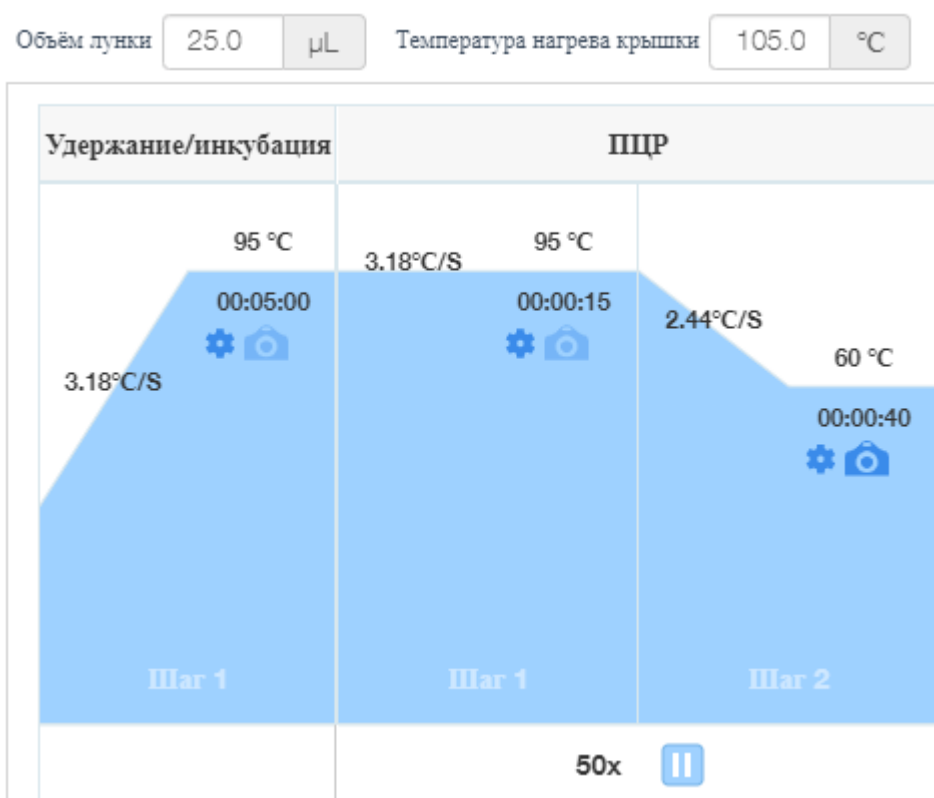
*В. Нажать кнопку **Создать эксперимент (Create New Experiments)** . Во вкладке **Свойства (Properties)** в строке **Название (Name)** задать имя (название) **Phyto\_DNA** эксперименту. Нажать внизу окна кнопку **Далее (Next)**.*



Г. Во вкладке **Протокол (Method)** задать циклограмму со следующими параметрами:  
Объем (Volume) 25  $\mu$ l

| Шаг | Стадия    | Температура | Время | Время изменения температуры | Регистрация сигнала                                                                 | Число циклов |
|-----|-----------|-------------|-------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1   | Удержание | 95°C        | 05:00 | 3,18°C/s                    |                                                                                     | —            |
| 1   | ПЦР       | 95°C        | 00:15 | 3,18°C/s                    |                                                                                     | 50           |
| 2   |           | 60°C        | 00:40 | 2,44°C/s                    |  |              |

Нажать кнопку **Далее (Next)**.



Д. В открывшемся окне во вкладке **Быстрая Настройка (Quick Setup)** в графе **Пассивный референсный краситель (Passive Reference)** выбрать **НЕТ (None)**, нажав на стрелку.

#### Plate Attributes

Passive Reference

None

Е. Во вкладке **Расширенные настройки (Advanced Setup)** в блоке **Мишени (Targets)** добавить каналы для считывания флуоресценции. Для этого необходимо выполнить следующие действия:

- В первой строке в графе **Название (Name)** вместо Target 1 написать **FAM**. В графе **Репортер (Reporter)** выбрать **FAM**. В графе **Гаситель (Quencher)** выбрать **None**, нажав на ячейку.
- Нажать на кнопку **Добавить (Add)**. В появившейся строке в графе **Репортер (Reporter)** выбрать **VIC**. В графе **Название (Name)** написать **HEX**. В графе **Гаситель (Quencher)** выбрать **None**, нажав на ячейку.

Quick Setup

Advanced Setup

Targets

+

Add

Action

▼

|                          |                                                                                   | Name | Reporter | Quencher | Comments | Task | Quantity |   |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------|----------|----------|----------|------|----------|---|
| <input type="checkbox"/> |  | FAM  | FAM      | None     |          | ▼    |          | ✕ |
| <input type="checkbox"/> |  | HEX  | VIC      | None     |          | ▼    |          | ✕ |

Ж. Для сохранения протокола нажать кнопку **Сохранить (Save)**.  
Сохранить протокол «Phyto\_DNA» в удобную папку.



4. Перейти во вкладку **Планшет (Plate)** и нажать на вкладку **Расширенные Настройки (Advances Setup)**.

5. Ввод образцов производится в таблице Excel (доступен на сайте ООО «Синтол» <http://www.syntol.ru/>) либо в программах Design and Analysis или QuantStudio™ Design & Analysis Software

6. Скопировать получившуюся таблицу Excel в программу прибора. Выделить все образцы и в таблице поставить галочки возле флуоресцентных красителей. Нажать кнопку **Далее (Next)**.

7. Начать работу прибора. Для этого нажмите на кнопку **Начать прогон (Start Run)** и выбрать нужный серийный номер прибора. Задать имя будущего файла с указанием даты проведения эксперимента. Сохранить файл на компьютере в удобной рабочей папке.

8. По завершении ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

### 7.2.6 Проведение ПЦР-РВ для прибора Gentier 96E/R

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу **Real-time PCR System**
3. Нажать **New Experiment**
4. В открывшемся окне задать имя эксперимента (**Experiment Name**) и выбрать папку для сохранения (**Save Path**)
5. Нажать **New**

6. Во вкладке **Run Setting** задать программу амплификации со следующими параметрам

| Stage | Stage Type           | Cycle | Time  | Temperature | Fluorescence |
|-------|----------------------|-------|-------|-------------|--------------|
| 1     | Preincubation        | 1     | 05:00 | 95,0        | None         |
| 2     | 2 Step Amplification | 50    | 00:15 | 95,0        | None         |
|       |                      |       | 00:40 | 60,0        | Reading      |

7. Во вкладке **Experiment** выставить объем реакционной смеси 25 мкл (**Reaction Volume 25µL**)

8. Перейти во вкладку **Sample Setting**

9. Обозначить на плашке месторасположение образцов:

- Первая лунка – **ПКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ПКО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Positive**.

- Вторая лунка – **ОКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ОКО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Negative**.

- Следующая лунка - исследуемый образец 1, затем – исследуемый образец 2 и т.д. в соответствии с п.4 **Поместить пробирки в амплификатор в рекомендуемом порядке**. Для этого выделить все оставшиеся лунки, в которых находятся пробирки с образцами, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Unknown**.

10. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям. Для этого выделить на плашке лунки со всеми исследуемыми пробирками (включая ПКО и ОКО) и поставить галочки в колонке **Dye** на красителях **FAM** и **HEX**.

11. Прейти во вкладку **Run Monitoring** и в открывшемся окне нажать **Run**.

По завершении ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

### 7.3 Процедура измерения результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью ПО приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96» или эквивалентных им (см. п. 5.1 настоящей инструкции). Критерием регистрации роста сигнала флуоресценции (наличие кинетической кривой роста сигнала флуоресценции) в ПО приборов является величина порогового цикла  $C_t$ , которая означает любую величину менее **50**. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается ПО прибора, например, как предельная величина порогового цикла ( $C_t \geq 50$  в приборах «АНК»), либо как ее отсутствие (**N/A** в приборах фирмы «BioRad») и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

## 7.4 Обработка результатов ПЦР-РВ

### 7.4.1 Порядок оценки результатов ПЦР-РВ для приборов RotorGene6000/RotorGene

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе «Rotor-Gene».
2. Нажать в меню программы «Rotor-Gene» клавишу «Analysis/Анализ», выбрать закладку «Quantitation/Количественный».
3. Выбрать строку с красителем Green и нажать клавишу «Show/Показать». В открывшемся окне появятся кинетические кривые в логарифмической шкале.
4. В меню окна «Quantitation Analysis/Количественный анализ» активировать:  
«Linear Scale/Линейная шкала»  
«Dynamic Tube/Динамич. фон»  
«Outlier Removal/Устранение выбросов» - 10%  
«Slope Correct/Коррект. уклона» *Примечание. При выполнении операции «Коррекция уклона» необходимо следить, чтобы не происходило кардинальных изменений в рисунке кинетических кривых (например, кривые без подъема флуоресценции после «коррекции уклона» преобразуются в линии с положительной динамикой флуоресценции и углом наклона). Если в результате проведения данной операции происходят кардинальные изменения в рисунке кинетических кривых, то операцию «Коррекция уклона» можно проводить **ТОЛЬКО** для образцов с подъемом флуоресценции в данном канале, т.е. **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ** по данному каналу!*  
В меню «CT Calculation/Вычисление СТ» установить значение для пороговой линии «Threshold/Порог» - 0,05 и «Eliminate cycles before/Исключить циклы до» - 10. *Примечание. Если не удастся установить значение порога на уровне 0,05 из-за фоновых флуктуаций флуоресценции отдельных кривых, то можно поднять значение пороговой линии до диапазона 0,05-0,1.*
5. Провести интерпретацию результатов, как описано в п.7.6 настоящей инструкции.

### 7.4.2 Обработка результатов ПЦР-РВ для прибора CFX96

1. Открыть файл в программе «Bio-Rad CFX Manager». Для этого в меню **File** выбрать **Open→Data File**, найти обрабатываемый файл и открыть его.
2. Установить расчет результатов анализа методом **Regression**. Для этого в меню **Settings** выбрать **Cq Determination Mode→Regression**.
3. Провести интерпретацию результатов, как описано в п.7.6 настоящей инструкции.

### 7.4.3 Обработка результатов ПЦР-РВ для приборов Dtpriime/Dtlite

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе «RealTime\_PCR».
2. Перед оценкой результатов необходимо установить следующие настройки:
  - Тип анализа: **Мультиплекс**
  - Метод: **Геометрический**
  - Выбрать оптический канал 
  - В правом нижнем углу открыть «Режимы просмотра данных»; выбрать «Режим Fam/Hex/Rox/Cy5»
  - При необходимости выбрать «Изменить масштаб одного из каналов». Выставить для **FAM** масштаб от 30 до 50%
  - Под графиками нажать Автошкалу  для выравнивания
  - В Таблице справа выбрать в закладке «Результаты» «Мультиплекс»
3. Провести интерпретацию результатов, как описано в п. 7.6 настоящей инструкции.

### 7.4.4 Обработка результатов ПЦР-РВ для приборов АНК-32 (32М, 48)

1. По окончании завершить исследование в соответствии с инструкцией к прибору.

2. В программе «ANK Shell» нажать «**Просмотр файлов данных**» и открыть файл с результатами исследования, выбрав его в папке соответствующего прибора.
3. Провести интерпретацию результатов, как описано в п.7.6 настоящей инструкции.

#### 7.4.5 Обработка результатов ПЦР-РВ для прибора QuantStudio5.

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе «QuantStudio Designs & Analysis Software» или «Design and Analysis».



2. Преобразовать кинетические кривые в линейную шкалу. Для этого нажать на иконку **Показать настройки файла (Show Plot Settings)**. В появившемся окне выбрать **Тип графика – Линейный (Graph Type – Linear)**.

3. Преобразовать полученные данные в необходимый формат с помощью специального шаблона Excel для **QuantStudio5**, актуален в случае обработки результатов в программе «QuantStudio™ Design & Analysis Software» (доступен на сайте ООО «Синтол», пароль для .rar **Syntol42!** <http://www.syntol.ru/>).
4. Провести интерпретацию результатов, как описано в п.7.6 настоящей инструкции.

#### 7.4.6 Обработка результатов ПЦР-РВ для прибора Gentier 96E/R.

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе **Real-time PCR System**.
2. Перейти во вкладку **Analysis** и провести интерпретацию результатов, как описано в п.7.6 настоящей инструкции.

### 7.5 Учет результатов анализа

Результаты анализа **не подлежат** учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала ОКО и ОКО-В по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** (ложноотрицательный результат всего эксперимента);

- в случае регистрации роста сигнала ОКО (ОКО-В) по каналу **FAM/Green** (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла  $C_t$  при этом не имеет значения.

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** одновременно с отсутствием сигнала по каналу **FAM/Green** (ложноотрицательный результат в конкретной пробирке);

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала ПКО по каналу **FAM/Green** (ложноотрицательный результат всего эксперимента).

Результаты анализа **подлежат** учету:

- в случае отсутствия роста сигнала флуоресценции ОКО (ОКО-В) по каналам **FAM/Green** одновременно с регистрацией роста сигнала по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC**;

- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** одновременно с отсутствием сигнала по каналу **FAM/Green**;

- в случае регистрации роста сигнала ПКО по каналам **FAM/Green**.

Регистрация роста сигнала флуоресценции в микропробирке с исследуемым образцом по каналу **FAM/Green** свидетельствует о наличии в образце специфического фрагмента ДНК *Candidatus Phytoplasma solani*. Величина порогового цикла  $C_t$  при этом не имеет значения.

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице.

**7.6 Интерпретация результатов анализа с использованием набора реагентов  
«Candidatus Phytoplasma solani-PB»**

|                                                                         |                        |            |                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|----------------------------------------------------------------------|
| Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу               |                        | Образец    | Интерпретация                                                        |
| FAM/<br>Green                                                           | R6G/HEX/<br>Yellow/VIC |            |                                                                      |
| Candidatus Phytoplasma solani                                           | ВПК                    |            |                                                                      |
| Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев |                        |            |                                                                      |
| —                                                                       | любой                  | ПКО        | Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ                   |
| —                                                                       | —                      | ОКО, ОКО-В | Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ                   |
| +                                                                       | любой                  | ОКО-В      | Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения НК   |
|                                                                         |                        | ОКО        | Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ  |
| Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы               |                        |            |                                                                      |
| —                                                                       | —                      | проба      | Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ                   |
| Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов   |                        |            |                                                                      |
| +                                                                       | любой                  | ПКО        | Набор реагентов специфичен в отношении Candidatus Phytoplasma solani |
| —                                                                       | +                      | ОКО-В      | Контаминация и ингибирование отсутствуют                             |
|                                                                         |                        | ОКО        |                                                                      |
| —                                                                       | +                      | проба      | В пробе не обнаружены ДНК Candidatus Phytoplasma solani              |
| ≤40 ct                                                                  | любой                  |            | В пробе обнаружена ДНК Candidatus Phytoplasma solani                 |

## **8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ**

### **8.1 Условия хранения**

Набор реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani-PB*» следует хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 18°C до минус 20°C. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 2 до плюс 8°C не должен превышать 5 суток в течение срока годности набора реагентов.

### **8.2 Условия транспортирования**

Транспортирование набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani-PB*» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от минус 18°C до минус 20°C. Допускается транспортирование до 5 суток при температуре до плюс 8°C.

### **8.3 Срок годности**

Срок годности набора «*Candidatus Phytoplasma solani-PB*» составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем.

Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

### **8.4 Информация по безопасной утилизации**

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 (либо специально предназначенное вспомогательное помещение) с целью последующей инактивации (МУ 1.3.2569-09).

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

### **8.5 Гарантийные обязательства производителя**

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество «*Candidatus Phytoplasma solani-PB*» направлять на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол» (125499, Москва, Кронштадтский бульвар, д. 39, к.1., пом 1 ком. 43/РМ 12-3, тел. (495)984-69-93, факс. (499)977-74-55, E. mail: [syntol@syntol.ru](mailto:syntol@syntol.ru)).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.