

**Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя сосудистого микоза дуба
методом полимеразной цепной реакции в реальном времени
«*Ceratocystis fagacearum*- РВ»**

ИНСТРУКЦИЯ по применению

1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1 Полное название

Набор реагентов для выявления ДНК *Ceratocystis fagacearum*, возбудителя сосудистого микоза дуба методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «*Ceratocystis fagacearum*- PB».

1.2 Область применения

Набор реагентов «*Ceratocystis fagacearum* -PB» предназначен для обнаружения ДНК возбудителя сосудистого микоза дуба *Ceratocystis fagacearum*.

Растениями-хозяевами *Ceratocystis fagacearum* являются различные растения рода *Quercus* sp. Признаком поражения является быстрое увядание, засыхание и побурение листовой. Распространение болезни может происходить с растительным материалом, при перевозке древесины и зараженных деревьев. Сосудистый микоз дуба относится к карантинным объектам, отсутствующим на территории Российской Федерации.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «*Ceratocystis fagacearum*-PB» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 6 компонентов.

	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1	Реакционная смесь « <i>C. fagacearum</i> -ВПК»	Прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета	1,10 мл	2 пробирки
2	TaqMut ДНК-полимераза ТМ+, 4 ед/мкл	прозрачная бесцветная жидкость	0,05 мл	1 пробирка
3	Положительный контрольный образец, содержащий фрагменты кДНК <i>Ceratocystis fagacearum</i> , ПКО « <i>C.fag</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 возбудителя сосудистого микоза дуба 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).

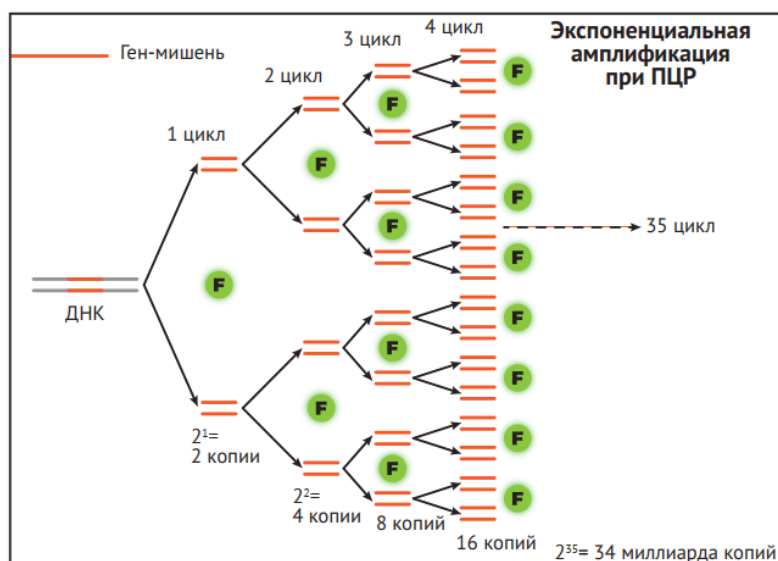


Рисунок 1 – Принцип аналитического процесса

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 четыре олигонуклеотидных праймера, фланкирующих специфический фрагмент ДНК *Ceratomyces fagacearum* и два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих ДНК внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ, а также три 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 «*Ceratomyces fagacearum*-РВ» позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси специфичный для сосудистого микоза дуба фрагмент гена (по каналу флуоресценции **R6G/HEX/Yellow/VIC**, а также внутренний положительный контроль (ВПК) – по каналу флуоресценции **Cy5/Red**.

2.4 Ограничения метода

В исследуемом материале ДНК *Ceratomyces fagacearum* может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения ДНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения НК на уровне не менее 20 %.

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 «*Ceratocystis fagacearum* -РВ» не менее $2,0 \cdot 10^3$ копий ДНК в миллилитре пробы.

3.2 Специфичность

Специфичность – ложноотрицательные результаты при анализе образцов растений, содержащих ДНК целевого объекта, отсутствовали, ложноположительные результаты при анализе образцов ДНК, не содержащих вышеперечисленные специфические фрагменты, отсутствовали.

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 пробам 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-РВ – 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

СТО ВНИИКР 3.009—2011 «Возбудитель сосудистого микоза дуба *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt. Методы выявления и идентификации»

6.2 Выделение НК

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

1. Разморозить необходимое количество пробирок с реакционной смесью «*C. fagacearum*-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.

2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать:

21*(N+2) мкл реакционной смеси «*C. fagacearum*-ВПК»

0,5*(N+2) мкл ТМ+(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
РС	63	84	105	126	147	168	189	210	231	252	273	294
ТМ+	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
РС	315	336	357	378	399	420	441	462	483	504	525	546
ТМ+	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
РС	567	588	609	630	651	672	693	714	735	756	777	798
ТМ+	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
РС	819	840	861	882	903	924	945	966	987	1008	1029	1050
ТМ+	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.

В подготовленные 0,2 мл пробирки внести по 5 мкл ОКО, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, ПКО, используя наконечники с аэрозольным барьером; плотно закрыть крышки; перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать пробирки для сброса капель.

- Поместить пробирки в амплификатор в рекомендуемом порядке:

№ ячейки	Образец
1	ПКО «C.fag»
2	ОКО
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

- Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
- Запустить программу «Rotor-Gene».
- В окне «New Run / Новый тест» выбрать вкладку «Advanced / Детальный мастер», затем опцию «Empty Run / Пустой шаблон» и нажать «New / Новый».
- 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».
- В открывшемся окне установить «Reaction Volume / Объем реакции» 25 мкл, убрать галочку «15 µL oil layer volume / Объем масла / воска» и нажать «Next / Далее».
- 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	95	5 mins	No acquiring		1
Cycling	95	15 secs	No acquiring		50
	60	40 secs	Acquiring	R6G/HEX/Yellow/VIC Cy5/ Red	

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

Yellow – 5

Red – 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 Автооптимизации уровня сигнала» нажать «ОК / ДА» для каждого канала.

После закрытия окна «Auto-Gain Optimization Channel Settings / Установки Автооптимизации 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 read

4. 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 **HEX**, **Cy5**. 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 **R6G**, **Cy5**. Задать имя будущего файла, а также выбрать тип прибора (32 пробирки или 48 пробирок).
4. В окне «**Амплификатор**» задать программу амплификации.

Тип	Температура, T, C	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 Dtpriime / 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 (**R6G** – специфика, **Cy5** – 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».
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».

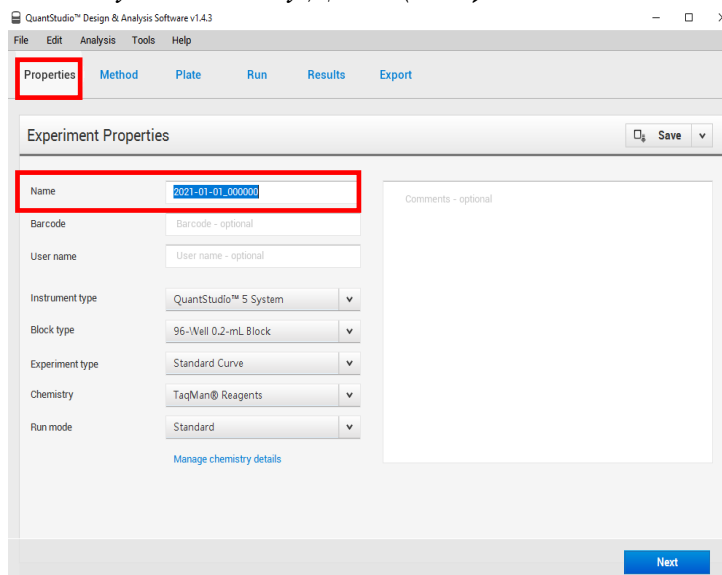
7.2.5 Проведение ПЦР-РВ для прибора QuantStudio5.

Порядок самостоятельного создания протокола «Phyto_DNA»

А. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

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

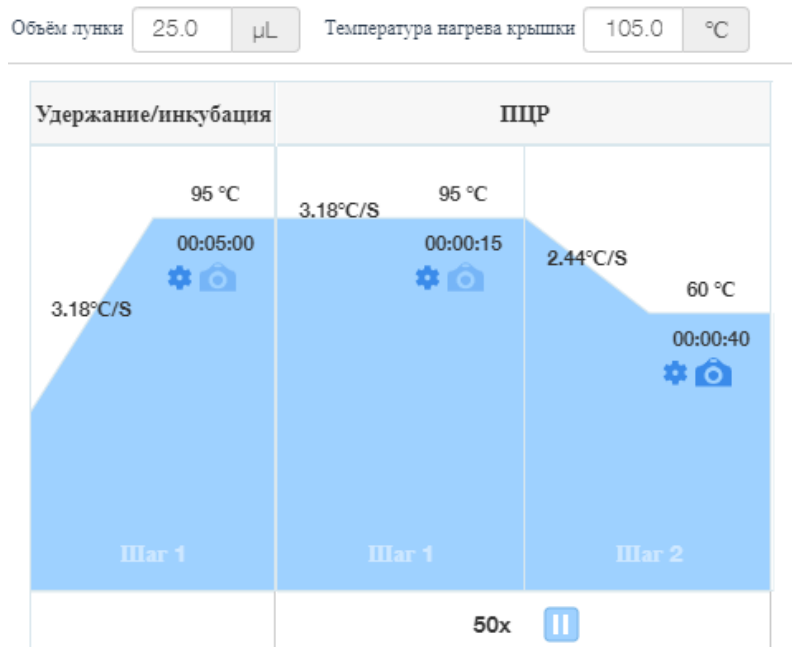
В. Нажать кнопку Создать эксперимент (Create New Experiments) . Во вкладке Свойства (Properties) в строке Название (Name) задать имя (название) Phyto_DNA эксперименту. Нажать внизу окна кнопку Далее (Next).



*Г. Во вкладке Протокол (Method) задать циклограмму со следующими параметрами:
Объем (Volume) 25 µl*

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 **HET (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 **R6G**. В графе **Репортер (Reporter)** выбрать **VIC**. В графе **Гаситель (Quencher)** выбрать **None**, нажав на ячейку.
- Нажать на кнопку **Добавить (Add)**. В появившейся строке в графе **Репортер (Reporter)** выбрать **Cy5**. В графе **Название (Name)** написать **Cy5**. В графе **Гаситель (Quencher)** выбрать **None**, нажав на ячейку.
- Нажать на кнопку **Добавить (Add)**. В появившейся строке в графе **Репортер (Reporter)** выбрать **Cy5**. В графе **Название (Name)** написать **Cy5**. В графе **Гаситель (Quencher)** выбрать **None**, нажав на ячейку.

Targets								
		Name	Reporter	Quencher	Comments	Task	Quantity	
☐		R6G	VIC	None		▼		✕
☐		Cy5	CY5	None		▼		✕

Ж. Для сохранения протокола нажать кнопку **Сохранить (Save)**  **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 **Cy5** 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 CT**» 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»
 - 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 «АНК 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 складку **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 **Cy5/Red** (ложноотрицательный результат всего эксперимента);

- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с ОКО (ОКО-В) по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения.

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу **Cy5/Red** одновременно с отсутствием сигнала по всем каналам **R6G/HEX/Yellow/VIC** (ложноотрицательный результат в конкретной пробирке);

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ПКО** по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** (ложноотрицательный результат всего эксперимента).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия роста сигнала флуоресценции в пробирке с ОКО (ОКО-В) по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** одновременно с регистрацией роста сигнала по каналу **Cy5/Red**;
- в случае регистрации роста сигнала **ПКО** по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** с любой величиной порогового цикла Ct.
- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу **Cy5/Red** с любой величиной порогового цикла при наличии сигнала флуоресценции по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC**.

Регистрация роста сигнала флуоресценции в микропробирке с исследуемым образцом по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** свидетельствует о наличии в образце специфического фрагмента ДНК сосновой нематоды. Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения.

**7.6 Интерпретация результатов анализа с использованием набора реагентов
«*Ceratocystis fagacearum* -РВ»**

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу		Образец	Интерпретация
R6G/HEX/Yellow/VIC	Cy5/ Red		
Ceratocystis fagacearum	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 Ceratocystis fagacearum
—	+	ОКО-В	Контаминация и ингибирование отсутствуют
		ОКО	
—	+	проба	В пробе не обнаружена ДНК Ceratocystis fagacearum
≤40 ct	любой		В пробе обнаружена ДНК Ceratocystis fagacearum

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

8.1 Условия хранения

Набор реагентов «*Ceratocystis fagacearum* -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 «*Ceratocystis fagacearum* -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 «*Ceratocystis fagacearum* -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 «*Ceratocystis fagacearum* -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).

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.