

**Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя суховершинности ясеня методом  
полимеразной цепной реакции в реальном времени  
«*Hymenoscyphus fraxineus*- PB»**

**ИНСТРУКЦИЯ по применению**

# 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

## 1.1 Полное название

Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя суховершинности ясеня методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «*Hymenoscyphus fraxineus* - РВ».

## 1.2 Область применения

Набор реагентов «*Hymenoscyphus fraxineus* -РВ» предназначен для обнаружения ДНК возбудителя суховершинности ясеня методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

*Hymenoscyphus fraxineus* – патогенный аскомицетный гриб, вызывающий суховершинность ясеня (ash dieback), болезнь ясеней (*Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia*) приводящую к потерям до 90% деревьев в лесах Европы (Baral et al., 2014). Патоген происходит из Восточной Азии, где основным хозяином является ясень маньчжурский (*Fraxinus mandshurica*). Суховершинность ясеня зарегистрирована в Европе с 1990-х годов и включена в перечень опасных заболеваний A2 List EPPO, как карантинный объект (Buschbom et al., 2014, Kowalski et al, 2016).

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

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «*Hymenoscyphus fraxineus* -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>H. fraxineus</i> -ВПК»                                                                            | Прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета | 1,10 мл | 2 пробирки |
| 2 | SynTaq ДНК-полимераза Т+, 5 ед/мкл                                                                                       | прозрачная бесцветная жидкость              | 0,05 мл | 1 пробирка |
| 3 | Положительный контрольный образец, содержащий фрагмент ДНК <i>Hymenoscyphus fraxineus</i><br>ПКО « <i>H. fraxineus</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 суховершинности ясеня 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).

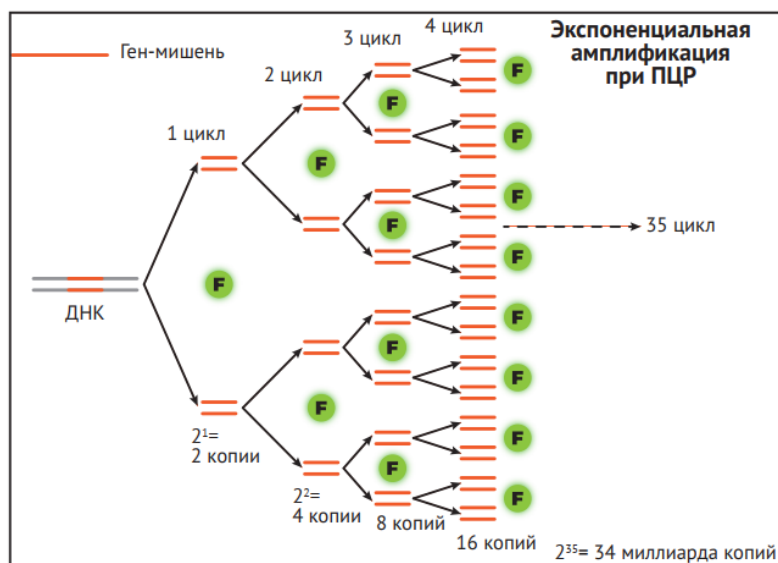


Рисунок 1 – Принцип аналитического процесса

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 *Hymenoscypus fraxineus* и два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих ДНК внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ, а также два флуоресцентных зонда. Процесс амплификации специфичных 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 «*Hymenoscypus fraxineus* -РВ» позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси специфичный для возбудителя суховершинности ясеня фрагмент гена по каналу флуоресценции **FAM/Green**, а также внутренний положительный контроль (ВПК) – по каналу флуоресценции **R6G/HEX/Yellow/VIC**.

## 2.4 Ограничения метода

В исследуемом материале ДНК *Hymenoscypus fraxineus* 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 «*Hymenoscyphus fraxineus* -РВ» не менее  $1,0 \cdot 10^3$  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 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-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:  
133-2017 МР ВНИИКР;

PM 7/117 (1) *Hymenoscaphus pseudoalbidus*. EPPO Bull, 43: 449-461. (2013)

### 6.2 Выделение НК

Выделение ДНК проводят сорбентным методом (например, «CytoSorb/Цитосорб», «Сорб-ГМО-Б» («Синтол», Россия) или другими утвержденными методами. 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°C в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

## 7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1 Подготовка к проведению ПЦР-РВ

- Разморозить необходимое количество пробирок с реакционной смесью «*H. fraxineus* -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 «*H. fraxineus* -ВПК»

**0,5\*(N+2) мкл** SynTaq ДНК-полимераза Т+, 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  |
| T+ | 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  |
| T+ | 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  |
| T+ | 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 |
| T+ | 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.

- 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.

4. Поместить пробирки в амплификатор в рекомендуемом порядке:

| № ячейки | Образец                     |
|----------|-----------------------------|
| 1        | ПКО « <i>H. fraxineus</i> » |
| 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

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       | 95        | 5 mins  | No acquiring |                                 | 1        |
| Cycling | 95        | 15 secs | No acquiring |                                 | 50       |
|         | 60        | 40 secs | Acquiring    | FAM/Green<br>R6G/HEX/Yellow/VIC |          |

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 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 **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, 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 (**FAM** – специфика, **HEX** – ВПК.)

- 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.
- Запуск программы амплификации осуществляется во вкладке «Запуск программы амплификации».
- 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 |

- 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».

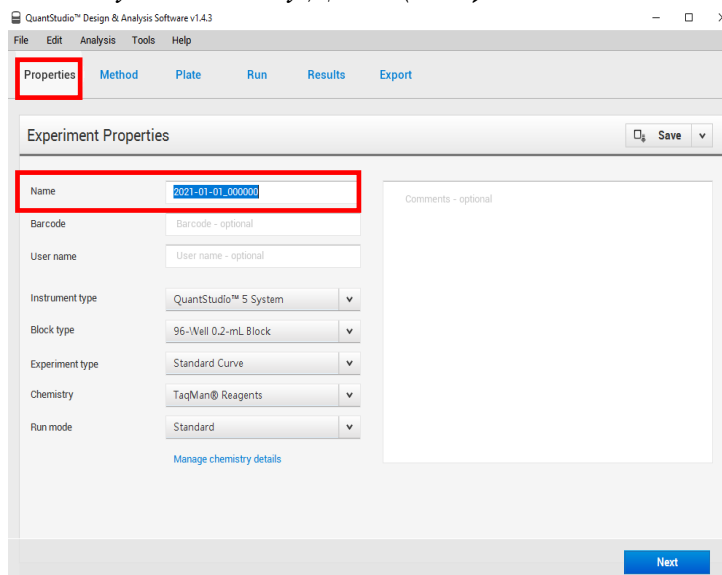
## 7.2.5 Проведение ПЦР-РВ для прибора QuantStudio5.

*Порядок самостоятельного создания протокола «Phyto\_DNA»*

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

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

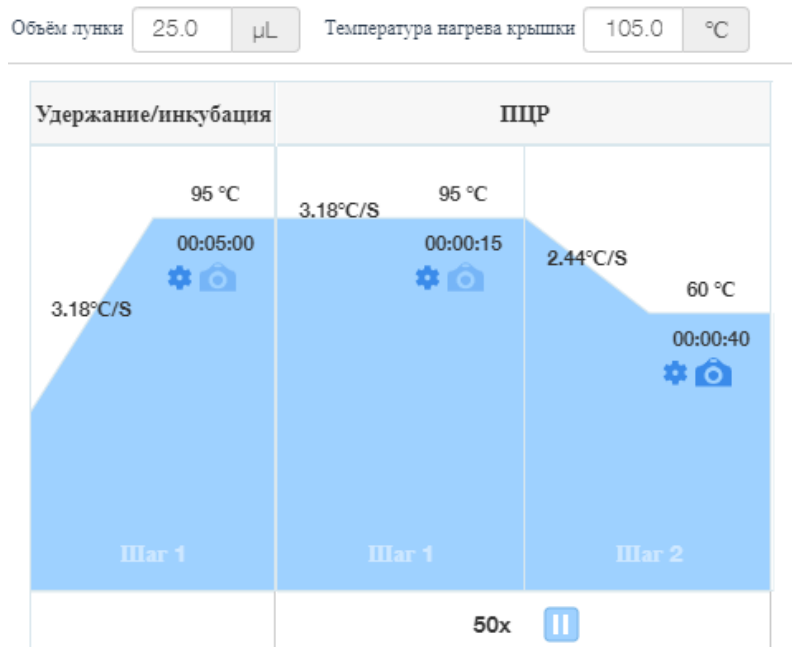
*В. Нажать кнопку Создать эксперимент (Create New Experiments) . Во вкладке Свойства (Properties) в строке Название (Name) задать имя (название) Phyto\_DNA эксперименту. Нажать внизу окна кнопку Далее (Next).*



*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 **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        |          |          |          |      |          |   |
|                          |                                                                                     |                |          |          |          |      |          |   |
|                          |                                                                                     | 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 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 Dtprime/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 «**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 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 **R6G/HEX/Yellow/VIC** (ложноотрицательный результат всего эксперимента);

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

- в случае регистрации роста сигнала **ПКО** по каналу **FAM/Green** с любой величиной порогового цикла  $C_t$ .

- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу **R6G/HEX/Yellow/VIC** с любой величиной порогового цикла при наличии сигнала флуоресценции по каналу **FAM/Green**

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

**7.6 Интерпретация результатов анализа с использованием набора реагентов  
«*Hymenoscypus fraxineus* -РВ»**

| Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу               |                        | Образец    | Интерпретация                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------|
| FAM/Green                                                               | R6G/HEX/<br>Yellow/VIC |            |                                                                       |
| <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>                                          | 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 <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> |
| —                                                                       | +                      | ОКО-В      | Контаминация и ингибирование отсутствуют                              |
|                                                                         |                        | ОКО        |                                                                       |
| —                                                                       | +                      | проба      | В пробе не обнаружена ДНК <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>              |
| ≤40 ct                                                                  | любой                  |            | В пробе обнаружена ДНК <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>                 |

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

### **8.1 Условия хранения**

Набор реагентов «*Hymenoscyphus fraxineus* -РВ» 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 «*Hymenoscyphus fraxineus* -РВ» 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 «*Hymenoscyphus fraxineus* -РВ» 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 «*Hymenoscyphus fraxineus* -РВ» 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.