




Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* в растительном материале и смывах методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых»

АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF F2180-1Z  96

Только для исследовательских
и других немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

 **НекстБИО**
Биотехнологическая
компания

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 3 |
| 1. НАЗНАЧЕНИЕ..... | 4 |
| 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА..... | 4 |
| 2.1. Состав и комплектность..... | 4 |
| 2.2. Принцип метода..... | 5 |
| 3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА..... | 6 |
| 4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ | 6 |
| 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ | 6 |
| 6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ..... | 8 |
| 6.1. Взятие исследуемого материала | 8 |
| 6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала | 8 |
| 6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов..... | 9 |
| 6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов...9 | |
| 7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ..... | 10 |
| 7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала | 10 |
| 7.2. Предварительная обработка..... | 11 |
| 8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 11 |
| 8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала | 11 |
| 8.2. Подготовка реагентов для амплификации | 12 |
| 8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции..... | 12 |
| 8.4. Анализ и обработка результатов | 13 |
| 8.5. Интерпретация результатов | 14 |
| 8.6. Возможные ошибки | 15 |
| 9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА..... | 16 |
| 9.1. Предел обнаружения..... | 16 |
| 9.2. Аналитическая специфичность | 16 |
| 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА..... | 17 |
| 10.1. Срок годности | 17 |
| 10.2. Транспортирование | 17 |
| 10.3. Хранение | 17 |
| 11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ | 17 |
| 12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ | 18 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|--------|--|
| Сt | Cycle threshold (пороговый цикл) |
| ВКО | внутренний контрольный образец |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ДНКаза | дезоксирибонуклеаза |
| дНТФ | дезоксирибонуклеозидтрифосфаты |
| НК | нуклеиновая кислота |
| ОК | отрицательный контроль |
| ОКО | отрицательный контрольный образец экстракции |
| К- | отрицательный контроль ПЦР |
| ПК | положительный контроль |
| ПКО | положительный контрольный образец |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| РНКаза | рибонуклеаза |
| УДГ | урацил-ДНК-гликозилаза |

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* в растительном материале и смывах методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых» предназначен для выявления ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* в растительном материале (побеги, соцветия, цветки, ветви, листья, плоды, в том числе от бессимптомных растений), смывах с поверхности рабочих инструментов, оборудования и тары методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в области фитосанитарного контроля.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Набор выпускается в единой форме. Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

| Реагент | Объем, мл | Количество | Описание |
|----------------|-----------|------------|--|
| ПЦР-смесь ErAm | 1,10 | 1 пробирка | Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ с дУТФ. Прозрачная жидкость. |
| Буфер В | 0,60 | 1 пробирка | Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость. |
| ПКО ErAm | 0,26 | 1 пробирка | Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость. |
| К- | 0,26 | 1 пробирка | Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость. |
| ВКО В | 1,10 | 1 пробирка | Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость |

Комплектность набора

| Компонент | Формат | Количество |
|---|---|------------|
| Набор реагентов «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых» | - | 1 |
| Инструкция по применению набора | в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru | - |
| Краткое руководство по применению набора | в бумажном виде | 1 |
| Паспорт качества на набор | в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru | - |
| Вкладыш к набору для автоматической обработки результатов | в бумажном виде | 1 |

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной амплификации участков ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* и экзогенного контроля (искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО В) при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термоллабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участки ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* и искусственно синтезированной последовательности ДНК экзогенного контрольного образца ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по двум каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

| Канал для флуорофора | FAM | R6G ¹ |
|----------------------|---|--|
| ДНК-мишень | ВКО В | ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых (<i>Erwinia amylovora</i>) |
| Область амплификации | искусственно синтезированная последовательность | Участок генома |

¹ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио», каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых» применяется только для исследовательских и других немедицинских целей.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов материалов может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. Применение набора возможно только персоналом, обученным правилам работы в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования.

4.5. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

4.6. С помощью набора «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом экстракции – ВКО В, входящим в состав набора реагентов. Без использования ВКО В невозможно провести оценку валидности постановки.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования. ПЦР-исследования должны проводиться с соблюдением требований методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПин 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения при проведении ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1% и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50 – 60 мл.

6.1.2. Пакеты и емкости для отбора, транспортирования и хранения полуфабрикатов, продуктов питания, однократного применения (Zip-Lock пакеты).

6.1.3. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5 или 15, или 50 мл.

6.1.4. Аналитические или прецизионные весы.

6.1.5. Стерильные перчатки.

6.1.6. Ножницы, скальпели, шпатели, пинцет.

6.1.7. Стерильный ватный тампон или марлевые салфетки.

6.1.8. Стерильный физиологический раствор.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл или 2,0 мл.

6.2.2. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5 или 15, или 50 мл.

6.2.3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 – 2,0 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.4. Центрифуга для полипропиленовых пробирок типа «Falcon» с ускорением не менее 2 000 g.

6.2.5. Фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.6. Ножницы, скальпели.

6.2.7. Анатомический пинцет.

6.2.8. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 10 до 1000 мкл.

6.2.9. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.10. Вортекс.

6.2.11. Стерильный физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер.

6.2.12. Мембранные фильтры с диаметром пор 450 мкм.

6.2.13. Ватно-марлевые фильтры.

6.2.14. Стеклоянная или полипропиленовая воронка.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия, или любой другой рекомендованный производителем набор, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из растительного материала (побеги, соцветия, цветки, ветви, листья, плоды, в том числе от бессимптомных растений) и смывов с поверхности рабочих инструментов, оборудования и тары для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;
- состав набора включает реагент ОКО (отрицательный контрольный образец);
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 200 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз/РНКаз, следующих видов:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс или отдельно вортекс и микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, 0,6 мл, 0,2 мл.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя - в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM и R6G с характеристиками, указанными в таблице 4.

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

| Канал для флуорофора | Длины волн, нм | | | |
|----------------------|----------------|----------|----------|----------|
| | Возбуждения | | Детекции | |
| | Минимум | Максимум | Минимум | Максимум |
| FAM | 450 | 470 | 510 | 530 |
| R6G | 515 | 532 | 545 | 580 |

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4$ °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

6.4.9. Холодильник, поддерживающий температурный режим от 2 до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат образцы ДНК, экстрагированные из следующих образцов:

- растительный материал (побеги, соцветия, цветки, ветви, листья, плоды, в том числе от бессимптомных растений);
- смывы с поверхности рабочих инструментов, оборудования и тары.

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с межгосударственным стандартом ГОСТ 12430-2019 «Карантин растений. Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях». Отбор, транспортирование и хранение исследуемых образцов следует проводить в соответствии с требованиями ГОСТов на соответствующий вид продукции.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

Отбор образцов продукции проводят по стандартам, устанавливающим порядок отбора проб. Транспортируют образцы в одноразовых стерильных контейнерах.

При отборе проб необходимо соблюдать меры по предотвращению контаминации образцов. Для этого отбор проб проводят в перчатках, используют одноразовые герметично закрывающиеся пластиковые контейнеры или пакеты, инструменты для отбора и измельчения материала, применяют однократно или стерилизуют в соответствии с регламентирующими документами.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре не выше минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. Предварительная обработка

ВНИМАНИЕ! Все исследуемые образцы должны пройти процедуру предварительной подготовки в соответствии с рекомендуемой ниже процедурой.

7.2.1. Исследуемые образцы массой не менее 100 мг растереть пестиком в ступке до гомогенного состояния.

Гомогенизацию образцов рекомендуется проводить с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора и сопутствующих расходных материалов.

7.2.2. К гомогенизированным образцам добавить Буфер Р² из расчета 1 мл Буфера Р на каждые 100 мг образца. В зависимости от консистенции образца продолжить гомогенизацию в ступке до получения однородной суспензии, либо тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе.

7.2.3. В чистые промаркированные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл отобрать до 1,2 мл полученной суспензии и инкубировать 10 минут при 65 °С, перемешивая содержимое на вортексе каждые 2 минуты.

7.2.4. Центрифугировать пробирки с исследуемыми образцами при 3 000 g³ в течение 5 минут. Надосадочную жидкость, полученную после предварительной обработки образцов, используют для выделения ДНК согласно Инструкции к набору реагентов «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия.

Смывы с поверхности рабочих инструментов, оборудования и тары проходят пробоподготовку согласно МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории⁴:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (**ОКО**)⁵ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (**ВКО В**).

² Реагент входит в состав набора «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия.

³ Для мини-центрифуг Eppendorf MiniSpin®/ MiniSpin® plus 6 500 обр/мин.

⁴ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁵ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем **исследуемого образца**⁶ – **200 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента **ВКО В** – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- объем реагента **ОКО** – **100 мкл** в пробирку для **ОКО**;
- объем **реагента**, используемого **для элюции ДНК**, – **100 мкл** при использовании набора для экстракции ДНК «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия, либо при использовании любого другого рекомендованного Производителем набора, соответствующего требованиям, указанным в п. 6.3. данной Инструкции.

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси ErAm** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов для реакционной смеси

| Реагент | Объем, мкл | Обозначения |
|----------------|--------------------|---|
| ПЦР-смесь ErAm | $10,0 \cdot (N+1)$ | N – количество амплифицируемых образцов ДНК, включая контроли |
| Буфер В | $5,0 \cdot (N+1)$ | |

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью ErAm** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученных на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции.

⁶ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) **положительный контроль ПЦР (ПК)** – в одну пробирку для образца **ПК** внести **10 мкл** реагента **ПКО ErAm**.

б) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в одну пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** реагента **К-**.

в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в одну пробирку для образца **ОК** внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения «Единой» программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------------------|-------------------|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | – | 45 |
| | 60 | 20 с | FAM, R6G | |

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание: необходимо перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

– в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению, инструкции по применению набора и краткому руководству, прилагаемому к набору.

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 2-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

| Канал для флуорофора | FAM | R6G ⁷ |
|----------------------|-----------|--|
| Продукт амплификации | ДНК ВКО В | ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых (<i>Erwinia amylovora</i>) |

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

– вручную в соответствии с таблицей 9 и кратким руководством, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 8 и в кратком руководстве, прилагаемом к набору;

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 8 и 9 соответственно, и в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Таблица 8

Критерии валидности для контрольных образцов

| Контроль | Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора | |
|---|--|---|
| | FAM | R6G |
| ОКО (отрицательный контрольный образец) | Определено значение Ct не выше граничного ⁸ | Отсутствует |
| К- (отрицательный контроль ПЦР) | Отсутствует | Отсутствует |
| ПКО ErAm (положительный контроль) | Отсутствует | Определено значение Ct не выше граничного |

⁷ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

⁸ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

| Результаты | Интерпретация |
|---|--|
| Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного значения ⁹ . | ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых <i>Erwinia amylovora</i> не обнаружена |
| Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено не выше граничного. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено или отсутствует. | ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых <i>Erwinia amylovora</i> обнаружена |
| Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует или определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено выше граничного. | Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ |
| Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного. | Результат недостоверный / сомнительный Рекомендуется повторить анализ |

ВНИМАНИЕ! В случае получения сомнительного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения сомнительного или получения отрицательного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование, начиная с этапа отбора материала.

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.2. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов другими образцами или продуктами амплификации на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G определены значения порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

8.6.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM, что свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку и исследование образца.

⁹ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения¹⁰

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл для ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* (см. таблицу 10). Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 10

Предел обнаружения набора

| ДНК-мишень | Предел обнаружения, копий/мл |
|---|------------------------------|
| ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых <i>Erwinia amylovora</i> | $1,0 \times 10^3$ |

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК различных растений и микроорганизмов (см. таблицу 11).

Таблица 11

Растения и микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

| Растения/микроорганизмы | |
|--|---|
| Черешня (<i>Prunus avium</i>) | Груша грушелистная (<i>Pyrus pyrifolia</i>) |
| Ирга ольхолистная (<i>Amelanchier alnifolia</i>) | Груша обыкновенная (<i>Pyrus communis</i>) |
| Кизильник блестящий (<i>Cotoneaster lucidus</i>) | Слива домашняя (<i>Prunus domestica</i>) |
| Айва обыкновенная (<i>Cydonia oblonga</i>) | Яблоня домашняя (<i>Malus domestica</i>) |
| Шиповник (<i>Rosa</i> sp.) | Рябина обыкновенная (<i>Sorbus aucuparia</i>) |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | <i>Ralstonia solanacearum</i> |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | <i>Pantoea stewartii</i> |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | <i>Bacillus cereus</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных растений и микроорганизмов с использованием набора перекрестных реакций не выявлено.

¹⁰ Предел обнаружения – 95 %-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемого возбудителя, при которой 95 % тестов дают положительный результат).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси ЕгАм и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® Бактериальный ожог плодовых» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Номер серии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению