

ИНСТРУКЦИЯ

по применению наборов реагентов
для выявления РНК фитопатогенных вирусов и вироидов
методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

Комплекс включает следующие наборы:

Вирус скручивания листьев картофеля

Вирус метельчатости верхушки картофеля

А потивирус картофеля

М карлавирус картофеля

S карлавирус картофеля

X вирус картофеля

Y потивирус картофеля

Вироид веретеновидности клубней картофеля

Дополнительно:

Актин картофеля (для контроля этапов выделения РНК и обратной транскрипции)

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

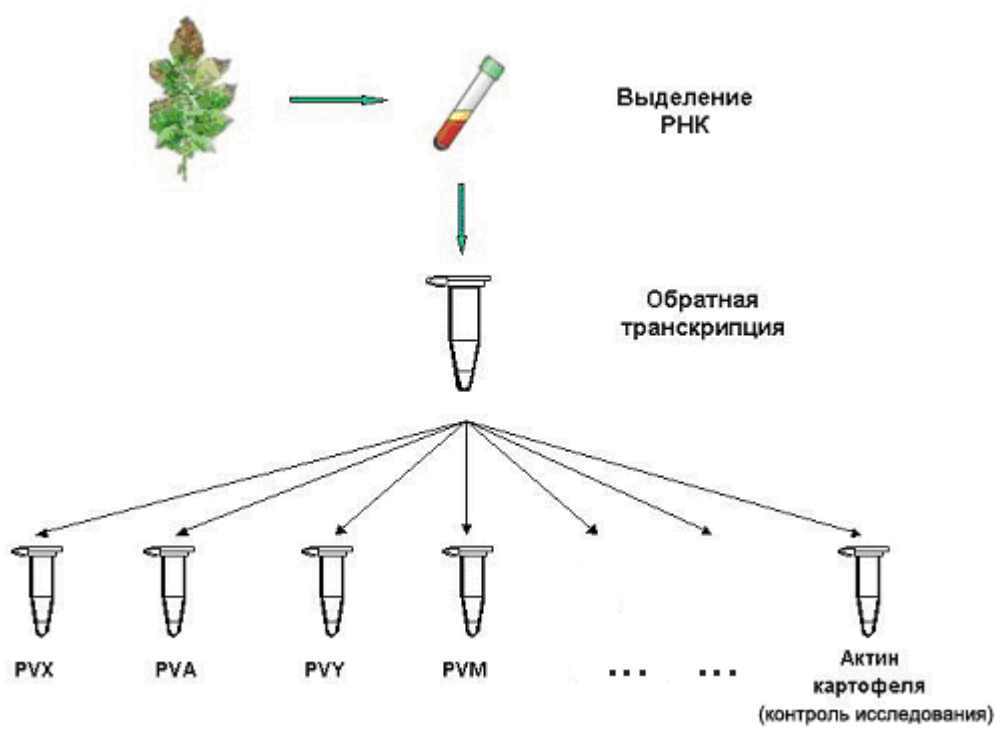


Схема исследования с использованием комплекса наборов реагентов для выявления РНК фитопатогенных вирусов и виридов

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Наборы реагентов предназначены для выявления РНК фитопатогенных вирусов (вирус скручивания листьев картофеля, вирус метельчатости верхушки картофеля, А потивирус картофеля, М карлавирус картофеля, S карлавирус картофеля, X вирус картофеля, Y потивирус картофеля, вириод веретеновидности клубней картофеля) *in vitro* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРОВ

1.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Наборы реагентов основаны на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции в смеси для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК).

В смеси для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены различными флуоресцентными метками, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК фитопатогенных вирусов и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

2.2 СОСТАВ НАБОРА

Каждый набор состоит из трех комплектов:

1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала включает:

- лизирующий раствор, 20 мл 1 флакон;
- реагент для преципитации, 15 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №1, 25 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 15 мл 1 флакон;
- буфер для растворения, 15 мл 1 флакон.

О возможности использования иных комплектов реагентов для выделения РНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

2. Комплект реагентов для проведения обратной транскрипции включает:

- ОТ-буфер, 100 мкл 1 пробирка;
- обратная транскриптаза, 25 мкл 1 пробирка;
- праймеры ОТ-RANDOM + дНТФ, 50 мкл 1 пробирка.

Примечание: Комплекты реагентов для выделения нуклеиновых кислот и для проведения обратной транскрипции являются *универсальными* для всех комплектов для ПЦР-амплификации кДНК фитопатогенных вирусов и виридов.

3. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 50 пробирок;
- раствор Taq-полимеразы, по 500 мкл 1 пробирка;
- буферный раствор ПЦР-буфер, 200 мкл 1 пробирка;
- минеральное масло, по 1,0 мл 1 пробирка;
- положительный контрольный образец (К+), 150 мкл 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды, внутренний контрольный образец. Буферный раствор «ПЦР-буфер» включен только в комплекты формата «Flash».

В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплект реагентов для ПЦР-амплификации выпускается в двух форматах:



«Форез» - предназначен для детекции результатов ПЦР только методом электрофореза, флуоресцентные ДНК-зонды в смеси для амплификации отсутствуют.



«Flash» - предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора (в качестве альтернативного способа учёта результатов можно использовать метод электрофореза).

Дополнительно по запросу потребителей возможна поставка комплекта реагентов для детекции ДНК методом электрофореза, включающий:

- смесь для электрофореза, 16,9 г 1 пакет;
- агарозный гель, 5 пластин.

Время проведения анализа - 5 ч.

Каждый набор рассчитан на проведение 50 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

2.1 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

В образцах биологического материала, содержащих РНК фитопатогенных вирусов, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации, ПЦР-детектор должен регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза, должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая продукту амплификации кДНК (таблица 2).

В образцах биологического материала, не содержащих РНК фитопатогенных вирусов, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации, ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая продукту амплификации кДНК (таблица 2) должна отсутствовать, при этом полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу (560 п.н.), должна быть отчетливо видна.

3.2 КОНТРОЛЬ ЭТАПОВ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК И ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Для контроля этапов выделения РНК (пробоподготовки) и обратной транскрипции рекомендуется применять комплект для ПЦР-амплификации кДНК актина растений. При этом в образцах биологического материала, для которых пробоподготовка, обратная транскрипция и амплификация проведены адекватно, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации с применением комплекта для амплификации кДНК актина растений, ПЦР-детектор должен регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза, должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая продукту амплификации кДНК актина растений (таблица 2).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.2 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3 Работать с набором следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.4 При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.5 Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.6 Приготовление реакционной смеси и выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.

4.7 Для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК, проведения ПЦР и электрофореза следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

4.8 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.9 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.10 Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

4.11 Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

4.13 Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

4.14 При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с наборами реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40-95 °С;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объёмом 0,6 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- наконечники вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки резиновые;
- пестики-гомогенизаторы для пробирок пластиковых объёмом 1,5 мл.

При работе с набором в формате «Flash» для детекции результатов требуется:

- ПЦР-детектор.

При детекции методом электрофореза:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1 мм.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Отбор и транспортировка пораженного растительного материала проводят согласно методическим рекомендациям «Диагностика фитопатогенных вирусов методом полимеразной цепной реакции» (РАСХН, ВНИИСХБ Москва 2005).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

3.1 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Внимание! Одновременно с выделением РНК из биологического материала необходимо провести пробоподготовку отрицательного контрольного образца (выделение РНК в пробирке «К-», не содержащей анализируемого материала).

Необходимо учесть, что для выделения РНК из каждого образца (включая «К-») потребуется две пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

7.1.1 Промаркировать необходимое количество пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К-».

7.1.2 20-30 мг растительной ткани (кусочек листа) поместить в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, добавить 100 мкл лизирующего раствора и тщательно растереть с помощью пестика-гомогенизатора (отдельного для каждого образца). В пробирку маркированную «К-» внести 100 мкл лизирующего раствора.

7.1.3 Добавить в каждую пробирку 300 мкл лизирующего раствора, закрыть крышки пробирок и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.4 Термостатировать пробирки при 65 °С в течение 20 мин.

7.1.5 Центрифугировать пробирки при 2000 об/мин в течение 10 мин.

7.1.6 Аккуратно, не задевая осадок, перенести 300 мкл надосадочной жидкости в новые промаркированные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.7 Добавить по 300 мкл реагента для преципитации и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.8 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.

7.1.9 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.10 Добавить к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.11 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.12 Не задевая осадок полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.13 Добавить к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.14 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.15 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.16 Открыть крышки пробирок и высушить осадок при 65 °С в течение 5 мин.

- 7.1.17 Добавить к осадку по 100 мкл буфера для растворения, закрыть крышки пробирок и термостатировать пробирки при 65 °С в течение 10 мин.
- 7.1.18 Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадить капли кратковременным центрифугированием на вортексе.

Препарат РНК готов для постановки реакции обратной транскрипции. Полученный препарат РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

7.2.1 Промаркировать необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 0,6 мл с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца «К-».

7.2.2 Разморозить содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» при комнатной температуре (18-25 °С), тщательно перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

7.2.3 В отдельной пластиковой пробирке приготовить ОТ-смесь путем смешивания ОТ-буфера, «праймеров ОТ-RANDOM +дНТФ» и обратной транскриптазы:

2,0x(N+1) мкл ОТ-буфера,

1,0x(N+1) мкл «праймеры ОТ-RANDOM +дНТФ»,

0,5x(N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом отрицательного контрольного образца «К-» (N) с запасом на 1 образец.

Примечание: обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

7.2.4 Внести по 3,5 мкл ОТ-смеси в промаркированные пробирки.

7.2.5 Перенести пробирки в рабочую зону, предназначенную для выделения РНК из биологического материала.

7.2.6 Внести в пробирки с ОТ-смесью (кроме пробирки «К-») по 16,5 мкл соответствующего препарата РНК (отдельным наконечником для каждого образца). В пробирку «К-» внести отрицательный контрольный образец, прошедший этап выделения РНК.

Примечание: Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы РНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.2.7 Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли кратковременным центрифугированием.

7.2.8 Инкубировать пробирки при температуре 40 °С в течение 40 мин, а затем при температуре 95 °С в течение 10 мин.

Примечание: Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» производства «НПФ ДНК-Технология»).

7.2.9 Осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.

7.2.10 Во все пробирки добавить по 80 мкл буфера для растворения (из комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот), тщательно перемешать пробирки на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

Полученный препарат кДНК готов к внесению в пробирки со смесью для амплификации. Для каждого препарата кДНК возможно проведение исследования на наличие кДНК нескольких фитопатогенных вирусов, а также контрольного исследования на наличие кДНК актина растений (см. рисунок 1). Для исследования на наличие кДНК каждого фитопатогенного вируса необходимо применять соответствующий комплект для ПЦР-амплификации кДНК. Например, при проведении исследования препарата кДНК на наличие X, Y и M вирусов картофеля необходимо применить комплекты для амплификации кДНК X, Y и M вирусов картофеля.

Для контроля этапов выделения РНК и обратной транскрипции каждого образца рекомендуется применение комплекта для амплификации кДНК актина картофеля (контроль исследования) одновременно с использованием комплектов для ПЦР-амплификации кДНК фитопатогенных вирусов.

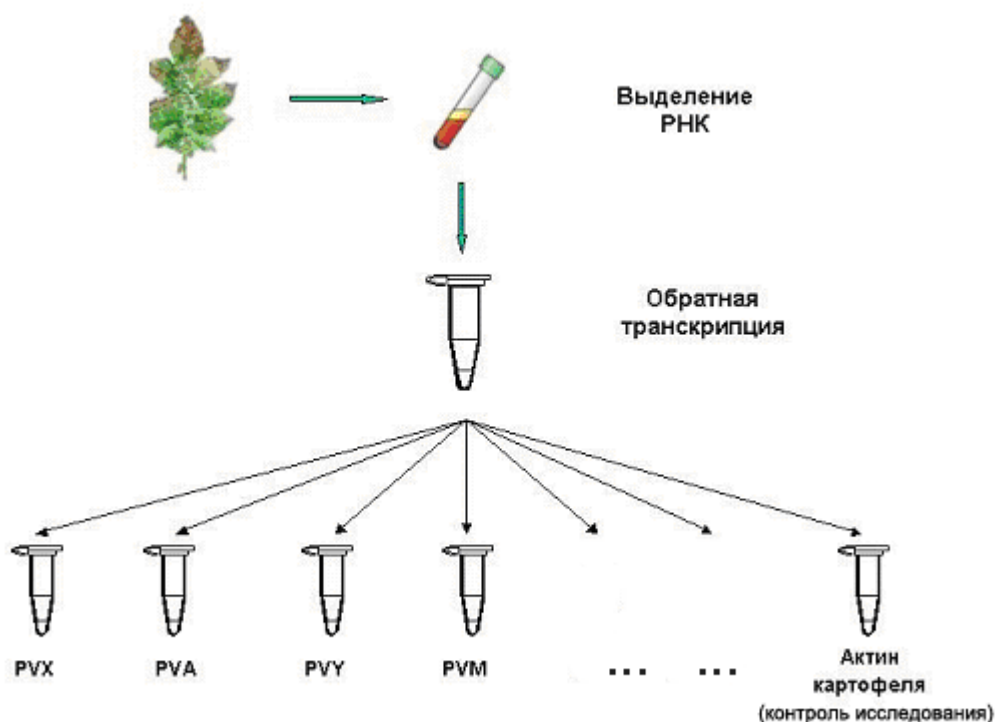


Рисунок 1. Схема исследования

Хранение препарата кДНК допускается при температуре минус 20 °С не более 1 мес.

7.3 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

- 7.3.1 Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца - «К-» и для положительного контрольного образца - «К+». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «Flash») промаркировать дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.
- 7.3.2 Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.
- 7.3.3 В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.
- 7.3.4 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения НК из биологического материала.
- 7.3.5 Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата кДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).
- Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы кДНК наконечниками с аэрозольным барьером.
- 7.3.6 В пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции, а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.3.7 В пробирки, промаркированные «ФОН», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.
- 7.3.8 Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин 3-5 с.
- 7.3.9 Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл.

После окончания амплификации пробирки перенести в помещение для проведения детекции результатов ПЦР.

Таблица 1.Режим амплификации
для амплификатора «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»)
Алгоритм регулирования: «точный»

| №№ п.п. | Температура | Время | Количество циклов |
|------------|----------------|------------|----------------------|
| 1. | 94 °С | 1 мин 30 с | 1 |
| 2. | 94 °С | 20 с | 5 |
| | 64 °С 67 °С | 5 с 5 с | |
| 3. | 94 °С | 1 с | 40 |
| | 64 °С | 5 с | |
| | 67 °С | 5 с | |
| 4. | 10 °С | хранение | |

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании.

Примечание: При работе с наборами в формате «Flash» готовые нормировочные пробирки («ФОН») допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при 2-8 °С в течение 1 месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25 °С), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-ДЕТЕКТОРА.

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору. Примечание: пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10; для внутреннего контроля – 2,50.

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.

8.2.1 Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объемом 1,0 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной

воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре в течение 1 недели или при температуре 2-8 °С в течение 1 мес.

8.2.2 Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.2.3 Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие диаметром примерно 2-3 мм с помощью стальной проволоки. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в емкости с водопроводной водой.

8.2.4 Аккуратно, не повреждая лунок, внести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор. ВНИМАНИЕ! В каждом ряду лунок обязательно должны быть представлены положительный («K+») и отрицательный («K-») контрольные образцы.

8.2.5 Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.2.6 После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.2.7 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.2.8 Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

8.3 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ДЕТЕКТОРА.

9.1.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором.

9.1.2 В биологических образцах, содержащих кДНК фитопатогенных вирусов, программа фиксирует положительный результат. Результат

амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

9.1.3 В биологических образцах, не содержащих кДНК фитопатогенных вирусов, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

9.1.4 В случае отрицательного результата на наличие кДНК фитопатогенных вирусов и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

9.1.5 При учёте результатов реакции с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат, в случае, если значение для специфики (кДНК фитопатогенных вирусов) попадает в зону неопределенности результатов. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

9.1.6 При получении положительного результата на наличие кДНК фитопатогенных вирусов для отрицательного контрольного образца («К-»), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.2 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

9.2.1 Учет результатов реакции проводится после проведения электрофореза продуктов амплификации в агарозном геле.

9.2.2 Для образцов, содержащих кДНК фитопатогенных вирусов должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, на уровне полосы положительного контрольного образца ДНК, соответствующая продукту амплификации фрагмента кДНК (таблица 2). Наличие или отсутствие полосы ДНК внутреннего контроля в этом случае в учет не принимают.

9.2.3 Для образцов, не содержащих кДНК фитопатогенных вирусов, в том числе в отрицательном контрольном образце, полоса оранжево-красного цвета, соответствующая продукту амплификации фрагмента кДНК (таблица 2) должна отсутствовать, при этом полоса ДНК внутреннего контроля размером 560 п.н. должна быть отчетливо видна.

9.2.4 В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей продукту амплификации фрагмента кДНК (таблица 2) и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контролю размером 560 п.н. результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

9.2.5 В случае наличия полосы, оранжево-красного цвета, соответствующей длине продукта амплификации фрагмента кДНК (таблица 2), в отрицательном контрольном образце («К-»), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Таблица 2

Длины продуктов ПЦР-амплификации кДНК

| Продукт ПЦР-амплификации | Длина продукта амплификации, п.н. |
|---|-----------------------------------|
| Вирус скручивания листьев картофеля | 260 |
| Вирус метельчатости верхушки картофеля | 264 |
| А вирус картофеля | 221 |
| М вирус картофеля | 160 |
| S вирус картофеля | 278 |
| X вирус картофеля | 167 |
| Y вирус картофеля | 241 |
| Вироид веретеновидности клубней картофеля | 260 |
| Актин картофеля | 300 |
| Внутренний контроль | 560 |

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 10.1 Срок годности наборов - 6 мес со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.
- 10.2 Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала, ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК следует хранить в тёмном месте при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.
- 10.3 Комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции следует хранить в при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.
- 10.4 Буферный раствор для электрофореза хранить при температуре 18-25 °С не более 7 дней или при температуре 2-8°С не более 1 мес.
- 10.5 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- 10.6 Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.
- 10.7 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.8 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества наборов следует обращаться в ООО «АгроДиагностика» по адресу:

117997 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая д.16/10, корп. 70
телефон: (495) 727-60-71,
e-mail: agrodiagnostica@bk.ru