

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для выявления ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*  
методом полимеразной цепной реакции

### ***Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus***

**ВНИМАНИЕ!** Изучите инструкцию перед началом работы

## 1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления *in vitro* ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с затравками (праймерами), специфичными для фрагмента генома *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*.

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор реагентов CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS основан на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

В наборе CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

В смесь 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, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

## 2.2 СОСТАВ НАБОРА

Набор состоит из двух комплектов:

Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала включает:

- лизирующий раствор, 7,5 мл 1 флакон;
- сорбент, 1,0 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №1, 10 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 10 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №3, 10 мл 1 флакон;
- элюирующий раствор, 5 мл 1 флакон.

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

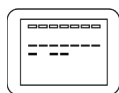
Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 50 пробирок;
- раствор Таq-полимеразы, 500 мкл 1 пробирка;
- буферный раствор ПЦР-буфер, 100 мкл 1 пробирка;
- минеральное масло, 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».

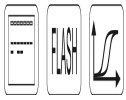
В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплект реагентов для ПЦР-амплификации выпускается в трёх форматах:



«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).



«Real-time» - предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов (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 - 4 ч.

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

### **3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

#### **3.1 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА**

В образцах биологического материала, содержащих ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, после проведения реакции амплификации, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза, должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* размером 136 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса, соответствующая фрагменту генома *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* размером 136 п.н., отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

## **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.

#### **4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

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

При работе с набором реагентов CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор (для наборов в форматах «Форез» и «Flash») или детектирующий амплификатор (для наборов в формате «Real-time»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный на 50°C;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 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 объемом 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки резиновые;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный;

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.

#### **5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

6.1 Отбор растительного материала, выделение возбудителя из растительного материала проводят согласно соответствующим методическим указаниям.

6.2 Для исследования с помощью набора CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS могут быть использованы: суспензия растительной ткани, бактериальные клетки с твердой питательной среды.

## 6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 6.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

- 7.1.1 Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугировать при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 7.1.2 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).
- 7.1.3 Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец «К-». Для этого в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл внести 50 мкл физиологического раствора стерильного.
- 7.1.4 Для обработки нескольких анализируемых образцов в отдельной пластиковой пробирке смешать  $150 \times (N+1)$  мкл лизирующего раствора и  $20 \times (N+1)$  предварительно ресуспендированного сорбента, где  $N+1$  – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.
- 7.1.5 Добавить по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 7.1.6 Термостатировать пробирки при 50 °С в течение 20 мин.
- 7.1.7 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.1.8 Удалить надосадочную жидкость.
- 7.1.9 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 7.1.10 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.1.11 Удалить надосадочную жидкость.
- 7.1.12 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 7.1.13 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.1.14 Удалить надосадочную жидкость.
- 7.1.15 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 7.1.16 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.1.17 Удалить надосадочную жидкость.
- 7.1.18 Открыть крышки пробирок и термостатировать пробирки при 50 °С в течении 5 мин.
- 7.1.19 Добавить к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 7.1.20 Термостатировать пробирки при 50 °С в течение 5 мин.
- 7.1.21 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в смесь для амплификации.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2-8 °С. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить п.7.1.20 - 7.1.21.

Если препарат ДНК предполагается хранить более 7 суток, необходимо надосадочную жидкость (п.7.1.21) перенести в новую пробирку и хранить при температуре минус 20 °С не более 6 месяцев.

Примечание: в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50 °С в течение 15-20 мин.

## 6.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

7.1.1 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.

7.1.2 Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Таq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.1.3 В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.

7.1.4 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения ДНК из биологического материала.

7.1.5 Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).

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

7.1.6 В пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.1), а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.1.7 В пробирки, промаркированные «ФОН», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.1.8 Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3-5 с.

7.1.9 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. Формат «Форез». 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
	67 °С	5 с	
	72 °С	1 с	
3.	94 °С	1 с	40
	67 °С	1 с	
	72 °С	1 с	
4.	10 °С	хранение	

Таблица 2. Формат «Flash». Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология») Алгоритм регулирования: «точный»

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °С	1 мин	1
2.	94 °С	5 с	5
	67 °С	15 с	
3.	94 °С	1 с	40
	67 °С	15 с	
4.	10 °С	Хранение	

Таблица 3. Формат «Real-time»  
Режим амплификации для детектирующего амплификатора  
«ДТ-322» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»)

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С 94 °С	30 с 1 мин 30 с	1
2.	94 °С 67 °С*	30 с 45 с	5
3.	94 °С 67 °С*	10 с 45 с	45
4.	10 °С	Хранение	

\* - регистрация результатов

Таблица 4. Формат «Real-time»  
Режим амплификации для амплификатора  
iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Режим для dynamicwf.tmo			
№№ п.п	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С 94 °С	30 с 1 мин 30 с	1
2.	94 °С 67 °С	30 с 45 с	5
3.	80 °С *	30 с	2
Режим амплификации			
1.	94 °С 67 °С *	10 с 45 с	45
2.	10 °С	хранение	

\* - регистрация результатов

**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.

## **7 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ**

### **7.1 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.

### **7.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ДТ-322.**

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322).

### **7.3 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА iCYCLER iQ (BIO-RAD LABORATORIES).**

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ).

### **7.4 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.**

8.4.1 Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объёмом 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.

8.4.2 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!

- 8.4.3 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.
- 8.4.4 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 («К+») и отрицательный («К-») контрольные образцы.
- 8.4.5 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).
- 8.4.6 После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.
- 8.4.7 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.
- 8.4.8 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.

## **8 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ**

### **8.1 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ДЕТЕКТОРА ИЛИ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА.**

- 9.1.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.
- 9.1.2 В биологических образцах, содержащих ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.
- 9.1.3 В биологических образцах, не содержащих ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.
- 9.1.4 В случае отрицательного результата на наличие ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа

фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторный отбор биологического материала.

9.1.5 При учёте результатов реакции с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат, в случае, если значение для специфики (наличие ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.1.6 При получении положительного результата на наличие ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* для отрицательного контрольного образца («К-»), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

## 8.2 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

9.2.1 В положительных образцах должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, на уровне полосы положительного контрольного образца ДНК, соответствующие фрагменту ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* размером 136 п.н. Наличие или отсутствие полосы ДНК внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимают.

9.2.2 В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* размером 136 п.н., должны отсутствовать, а полоса внутреннего контрольного образца размером 560 п.н. должна быть отчетливо видна.

9.2.3 В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* размером 136 п.н. и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н. результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.2.4 В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* размером 136 п.н., в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

## **9 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

10.1 Срок годности набора - 6 мес со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

10.2 Комплект 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 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- лизирующий раствор, промывочный раствор № 1, промывочный раствор № 2, промывочный раствор № 3 хранить при температуре 18-25 °С в течение всего срока годности набора; лизирующий раствор №2 и промывочный раствор №1 следует хранить в темном месте;
- сорбент; элюирующий раствор хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора;
- буферный раствор для электрофореза хранить при температуре 18-25 °С не более 7 дней или при температуре 2-8°С не более 1 мес.

10.4 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора. Допускается транспортирование набора не более 7 дней при температуре 2-8 °С.

10.5 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.6 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.7 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS, 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

