

## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов  
для выявления РНК вируса шарки (оспы) сливы  
методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

### **PLUM POX VIRUS**

**ВНИМАНИЕ!** Изучите инструкцию перед началом работы

## **1 НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов предназначен для выявления РНК вируса шарки (оспы) сливы *in vitro* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

## **2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

### **1.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ**

Набор реагентов PLUM POX POTYVIRUS основан 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 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 кДНК вируса шарки (оспы) сливы 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 трех комплектов:

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала включает:

- лизирующий раствор, 40 мл 1 флакон;
- реагент для преципитации, 30 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №1, 50 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 30 мл 1 флакон;
- буфер для растворения, 30 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.

Комплект реагентов для проведения обратной транскрипции включает:

- ОТ-буфер, 200 мкл 1 пробирка;
- обратная транскриптаза, 50 мкл 1 пробирка;
- праймеры ОТ-PPV + дНТФ, 100 мкл 1 пробирка;

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

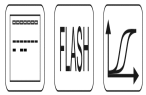
- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 100 пробирок;
- раствор Таq-полимеразы, по 500 мкл 2 пробирки;
- буферный раствор ПЦР-буфер, 200 мкл 1 пробирка;
- минеральное масло, по 1,0 мл 2 пробирки;
- положительный контрольный образец (К+), 150 мкл 1 пробирка.

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».

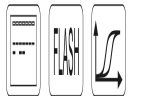
В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплект реагентов для ПЦР-амплификации выпускается в трёх форматах:



«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 - 5 ч.

Набор рассчитан на проведение 100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

### **3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

#### **1.1 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА**

В образцах биологического материала, содержащих РНК вируса шарки (оспы) сливы, после проведения реакций обратной транскрипции и амплификации, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза, должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту кДНК вируса шарки (оспы) сливы размером 268 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих РНК вируса шарки (оспы) сливы, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса, соответствующая фрагменту кДНК вируса шарки (оспы) размером 268 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 PLUM POX POTYVIRUS 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, поддерживающий температуру 40-95 °С;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объемом 0,6 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;
- пестики-гомогенизаторы для пробирок пластиковых объемом 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.

#### **5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Отбор и транспортировка пораженного растительного материала проводят согласно соответствующим методическим указаниям и инструкциям.

## 6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 1.1 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 «праймер ОТ-PPV+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-PPV+дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0x(N+1) мкл ОТ-буфера,
- 1,0x(N+1) мкл «праймеры ОТ-PPV+дНТФ»,
- 0,5x(N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N+1 – количество анализируемых на наличие РНК вируса шарки (оспы) сливы 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.

Полученный препарат кДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

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 для учета результатов амплификации ПЦР-детектора (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 Таq-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 РНК из биологического материала.

7.3.5 Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл 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. 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 этапы выделения РНК и обратной транскрипции.

7.3.8 Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин в течение 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. Форматы «Форез» и «Flash».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	5 с	
3.	67 °С	5 с	40
	94 °С	1 с	
	64 °С	5 с	
67 °С	5 с		
4.	10 °С	Хранение	

Таблица 2. Формат «Real-time»

Режим амплификации для детектирующего амплификатора «ДТ-322» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»)

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С	30 с	1
	94 °С	1 мин 30 с	
2.	94 °С	30 с	5
	64 °С*	15 с	
3.	94 °С	10 с	45
	64 °С*	15 с	
4.	10 °С	Хранение	

\* - регистрация результатов

Таблица 3. Формат «Real-time»

Режим амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Режим для dynamicwf.tmo			
№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С	30 с	1
	94 °С	1 мин 30 с	
2.	94 °С	30 с	5
	64 °С	45 с	
3.	80 °С *	30 с	2
Режим амплификации			
1.	94 °С	10 с	45
	64 °С *	45 с	
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**

### **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 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).

### **8.3 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).

### **8.4 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

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

8.4.2 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 («K+») и отрицательный («K-») 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.

## **9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ**

9.1 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 РНК вируса шарки (оспы) сливы, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

9.1.3 В биологических образцах, не содержащих РНК вируса шарки (оспы) сливы, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

9.1.4 В случае отрицательного результата на наличие РНК вируса шарки (оспы) сливы и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный.

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

9.1.5 При учёте результатов реакции с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат, в случае, если значение для специфики (кДНК вируса шарки сливы) попадает в зону неопределенности результатов. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.1.6 При получении положительного результата на наличие РНК вируса шарки (оспы) сливы 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 В положительных образцах должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, на уровне полосы положительного контрольного образца ДНК, соответствующие амплифицированному фрагменту кДНК вируса шарки (оспы) сливы размером 268 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 амплифицированному фрагменту кДНК вируса шарки (оспы) сливы размером 268 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 амплифицированному фрагменту кДНК вируса шарки (оспы) сливы размером 268 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 амплифицированному фрагменту кДНК вируса шарки (оспы) сливы размером 268 п.н., в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

## **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 НК 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 Комплект 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

