

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

**Диагностика ряда карантинных фитопатогенов
методом полимеразной цепной реакции
с флуоресцентной детекцией результатов
при помощи диагностических наборов производства
ООО «АгроДиагностика»**

(МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ)

**Рассмотрено и одобрено
Ученым Советом ИБХ РАН
26 октября 2016 г. Протокол № 8**

**Председатель Ученого Совета, академик
В.Т. Иванов**



Москва 2016

Методические указания подготовлены на основе исследований, проведенных научными коллективами ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и ООО «АгроДиагностика» в составе: к.б.н. Д.Ю. Рязанцев, к.б.н. А.А. Стахеев, к.б.н. П.Е. Дробязина, Н.В. Кокорев, проф., чл.-корр. РАН С.К. Завриев.

Рецензент – проф., д.б.н. Л.И. Патрушев

Методические указания предназначены для специалистов лабораторий, аккредитованных национальным органом по аккредитации на право проведения лабораторных исследований в области карантина растений в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Введение

Значительную долю в продовольственном обеспечении Российской Федерации составляет импорт. Потребность продуктов питания в ряде регионов более чем на 50%, а в городах-мегаполисах до 80% покрывается за счет ввоза продуктов питания из других стран. Поступление импортной сельскохозяйственной продукции сопряжено с угрозой ввоза и распространения на территории страны карантинных вредителей, болезней и сорных растений, которые могут нанести огромный экономический вред. Поэтому четкая, чувствительная и своевременная диагностика карантинных фитопатогенов с целью предотвращения их проникновения и распространения на территории Российской Федерации при осуществлении мер по внешнему и внутреннему карантину растений является важной государственной задачей.

В настоящее время в РФ подавляющее большинство лабораторий, рутинно проводящих диагностику фитопатогенов, в качестве основного метода используют иммуно-ферментный анализ (ИФА). Постепенно на смену ИФА приходит более чувствительный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Повышенная чувствительность и возможность в некоторых модификациях ПЦР проводить количественную оценку присутствия фитопатогена делает этот метод более предпочтительным при диагностике карантинных объектов. Компания ООО «АгроДиагностика» разработала наборы для диагностики ряда карантинных фитопатогенов методом ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов (FLASH-ПЦР, ПЦР в реальном времени). Применение таких диагностических наборов позволяет в течение нескольких часов получить надежные, быстрые и достоверные (специфичность анализа составляет более 99%) результаты, обеспечивающие проверку подкарантинной продукции на наличие объектов внутреннего и/или внешнего карантина.

Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания (МУ) содержат описание методов качественного определения карантинных патогенов растений:

- сосновая стволовая нематода (*Bursaphelenchus xylophilus*) и ее вид-двойник (*B. mucronatus*);
- бледная (*Globodera pallida*) и золотистая (*Globodera rostochiensis*) картофельные цистообразующие нематоды;
- кольцевая гниль картофеля (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*);
- бурая бактериальная гниль картофеля (*Ralstonia solanacearum*);
- бактериальный вилт кукурузы (*Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*);
- бактериальный ожог плодовых (*Erwinia amylovora*);
- вирус шарки сливы (Plum Pox Potyvirus);
- средиземноморская плодовая муха (*Ceratitis capitata*);
- ризомания сахарной свеклы (вирус некротического пожелтения жилок сахарной свеклы, beet necrotic yellow vein virus); патоген, карантинный на территории Украины
- андийский вирус крапчатости картофеля (Andean potato mottle virus);
- андийский латентный вирус картофеля (Andean potato latent virus);
- фомопсис подсолнечника *Diaporthe helianthi* (*Phomopsis helianthi*);
- вириод веретеновидности клубней картофеля (Potato spindle tuber viroid);
- вирус кольцевой пятнистости томата (Tomato ringspot virus)
- вирус кольцевой пятнистости табака (ВКПТ), Tobacco ringspot virus (TRSV)
- вирус кольцевой пятнистости малины (ВКМ), Raspberry ringspot virus (RPRV); внесен в список регулируемых некарантинных объектов на территории РФ.

- вирус чёрной кольцевой пятнистости картофеля (ВЧКПК), Potato black ringspot virus (PBRV)

1.2. Диагностика осуществляется с использованием наборов производства ООО «АгроДиагностика» методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При использовании данных наборов возможны три способа визуализации результатов амплификации: флуоресцентная детекция продуктов амплификации непосредственно после проведения ПЦР методом FLASH (Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization), детекция в ходе реакции методом ПЦР в реальном времени, также возможна детекция в формате гель-электрофореза. Последний способ детекции не рекомендуется для использования ввиду опасности появления кросс-контаминации образцов.

1.3. МУ предназначены для проведения лабораторных исследований в области карантина растений образцов подкарантинной продукции в целях определения соответствия ее состояния карантинным фитосанитарным требованиям

1.4. МУ могут применяться для детекции перечисленных выше карантинных фитопатогенов в подкарантинной продукции.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон от 21 июля 2014 г. N 206-ФЗ "О карантине растений"

2.2. ГОСТ 20562-2013 «Карантин растений. Термины и определения» (принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации; протокол от 14 ноября 2013 г. N 44-2013).

2.3. ГОСТ 21507-2013 «Защита растений. Термины и определения» (принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации; протокол от 27 декабря 2013 г. N 63-П).

2.4. Решение комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 N 318 (ред. от 16.05.2016) "Об обеспечении карантина растений в Евразийском экономическом союзе"

2.5. Постановление Правительства РФ от 31.01.2013 N 69 "Об утверждении Положения о федеральном государственном карантинном фитосанитарном надзоре"

2.6. Приказ Минсельхоза России от 22.04.2009 N 160 (ред. от 26.03.2013) "Об утверждении Правил проведения карантинных фитосанитарных обследований" (Зарегистрировано в Минюсте России 22.05.2009 N 13982)

2.7. Методические указания МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I — IV групп патогенности"

2.8. Руководство "Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях" Р 3.5.1904-04. М.: 2005.

3. Принцип метода

Метод выявления фитопатогенов в семенах, растительном материале и, при необходимости, других видов подкарантинной продукции с помощью диагностических наборов ООО «АгроДиагностика» основан на использовании ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов амплификации непосредственно после завершения реакции амплификации (FLASH-ПЦР) или режиме реального времени (Real-Time PCR).

3.1 Этапы определения фитопатогенов

Качественное определение присутствия выше описанных карантинных фитопатогенов с помощью диагностических наборов ООО «АгроДиагностика» состоит из следующих этапов (Приложение 1):

3.1.1. Отбор проб анализируемого образца.

3.1.2. Выделение нуклеиновых кислот: тотальной ДНК из исследуемого образца с помощью реагентов «ПРОБА-ГС» (для культур микроорганизмов, нематод, растительного материала), «ПРОБА-Рapid» (для культур микроорганизмов, нематод) или «ПРОБА-НК» для выделения тотальной РНК (для образцов растительного материала при тестировании на вирус шарки сливы, андийский вирус крапчатости и андийский латентный вирус картофеля, вириод веретеновидности клубней картофеля, вирус кольцевой пятнистости томата, вирус кольцевой пятнистости табака, вирус кольцевой пятнистости малины, вирус чёрной кольцевой пятнистости картофеля) производства ООО «АгроДиагностика».

3.1.2.1. При анализе на вирус шарки сливы, андийский вирус крапчатости и андийский латентный вирус картофеля, вириод веретеновидности клубней картофеля, вирус кольцевой пятнистости томата, вирус кольцевой пятнистости табака, вирус кольцевой пятнистости малины, вирус чёрной кольцевой пятнистости картофеля проводится реакция обратной транскрипции (ОТ) с тотальной РНК с использованием набора для ОТ производства ООО «АгроДиагностика».

3.1.3. Выявление в выделенной ДНК/кДНК генетического материала анализируемого фитопатогена с помощью соответствующего диагностического набора в соответствии с инструкцией по применению.

3.1.4. Детекция результатов амплификации после проведения ПЦР с помощью ПЦР-детектора «ДЖИН» (производства ООО «НПО ДНК-Технология») в формате FLASH или в формате Real-Time PCR в ходе реакции.

4. Требования к помещениям и техника безопасности

4.1. Общие требования

Общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны соответствовать требованиям 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".

4.2. Правила работы с диагностическими наборами и оборудованием

4.2.1. Исследование материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I - IV групп патогенности, методами амплификации нуклеиновых кислот (сигнала), связано с необходимостью одновременного обеспечения и соблюдения персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

4.2.2. Все компоненты наборов реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2.3. Работать с наборами следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.2.4. При детекции в формате гель-электрофореза необходимо соблюдать следующие меры предосторожности: при работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской; запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания, так как высокое напряжение опасно для жизни.

4.2.5. На стадиях диагностики следует использовать только новые наконечники и пробирки, не допускается использование одних и тех же

наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.2.6. Выделение НК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с включенным ламинарным током воздуха.

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

4.2.8. 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.

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

4.2.10. Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно облучать бактерицидными облучателями как до, так и после окончания работ в соответствии с требованиями Рекомендаций Р 3.5.1904-04.

5. Оборудование, материалы и реактивы

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09.

5.1. Оборудование и материалы:

- ДНК амплификатор, детектирующий амплификатор (обязателен для формата детекции в «реальном времени»);
- ПЦР-детектор «ДЖИН» (производства ООО «НПО ДНК-Технология») или аналоги для формата детекции FLASH;

- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный с прижимной крышкой, поддерживающий температуру 95°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 одноразовые 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;
- штативы для микропробирок на 0,2 мл; на 0,6 мл; на 1,5 мл;
- холодильник с отделениями на 2...8°C и на -18...-20°C (ГОСТ 26678);
- весы лабораторные общего назначения второго класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2 000 г (ГОСТ 24104);
- пинцеты медицинские (ГОСТ 21241-89);
- ножницы медицинские;
- скальпели хирургические (ГОСТ 21240);
- ступки фарфоровые с пестиком.

5.2. Реактивы.

5.2.1. Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала «ПРОБА-ГС» (ООО «АгроДиагностика»), включающий (на 50 выделений):

- лизирующий раствор, 15 мл, 1 флакон;
- сорбент, 2 мл, 1 флакон;
- промывочный раствор №1, 20 мл, 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 20 мл, 1 флакон;
- промывочный раствор №3, 20 мл, 1 флакон;
- элюирующий раствор, 10 мл, 1 флакон.

5.2.2. Комплект реагентов для выделения РНК из растительного материала «ПРОБА-НК» (ООО «АгроДиагностика»), включающий (на 50 выделений):

- Лизирующий раствор 20 мл 1 флакон
- Реагент для преципитации НК 20 мл 1 флакон
- Промывочный раствор №1 25 мл 1 флакон
- Промывочный раствор №2 15 мл 1 флакон
- Буфер для растворения НК 1,25 мл 2 пробирки

5.2.3. Буфер STE (10мМ TrisCl, рН 8.0, 1мМ EDTA, 0.1М хлорид натрия) для выделения ДНК из цист нематод.

5.2.4. Комплект реагентов для выделения ДНК «ПРОБА-Рапид» (ООО «АгроДиагностика»), включающий (на 100 выделений):

- Реактив «Проба-Рапид», 100 пробирок по 500 мкл.

5.2.5. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК, включающий (на 50 образцов):

- амплификационная смесь, запечатанная парафином, 50 пробирок по 20 мкл;
- минеральное масло;

- раствор Таq-полимеразы, 500 мкл, 1 пробирка;
- буферный раствор «ПЦР-буфер», 200 мкл, 1 пробирка;
- положительный контрольный образец кДНК, 150 мкл, 1 пробирка.

Примечание: «ПЦР-буфер» входит в состав только наборов для ПЦР в формате FLASH.

Смесь для амплификации, запечатанная парафином, включает: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, флуоресцентные ДНК-зонды, праймеры, внутренний контрольный образец.

6. Отбор, хранение и подготовка образцов для анализа

Отбор, хранение и подготовку образцов для анализа проводят в соответствии с требованиями ФЗ от 21 июля 2014 г. N 206-ФЗ.

7. Порядок проведения анализа

7.1. Выделение нуклеиновых кислот

7.1.1. Выделение ДНК из культур микроорганизмов с помощью набора реагентов «ПРОБА-ГС».

Соблюдение последовательности операций и аккуратное выполнение выделения ДНК из анализируемого биологического материала является обязательным.

7.1.1.1. Для обработки нескольких (N) образцов смешать в отдельной пробирке $150 \times (N+1)$ мкл лизирующего раствора и $20 \times (N+1)$ предварительно ресуспендированного сорбента.

7.1.1.2. Добавить по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом (50 мкл суспензии) и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.1.3. Термостатировать пробирку в течение 20 мин при 50°C, периодически помешивая.

7.1.1.4. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.1.5. Удалить надосадочную жидкость.

7.1.1.6. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.1.7. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.1.8. Удалить надосадочную жидкость.

7.1.1.9. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.1.10. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.1.11. Удалить надосадочную жидкость.

7.1.1.12. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.1.13. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.1.14. Удалить надосадочную жидкость.

7.1.1.15. Открыть крышку пробирки и термостатировать пробирку при 50°C в течении 5 мин.

7.1.1.16. Добавить к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 5-10 сек.

7.1.1.17. Термостатировать пробирку при 50°C в течение 5 мин.

7.1.1.18. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин. Если образец предполагается хранить, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку. Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Примечание: в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; при наличии осадка необходимо перед началом работы проинкубировать флакон при 50°C в течение 15-20 мин для растворения осадка.

При выделении ДНК из плотного или загрязненного различными примесями субстрата следует разделить стадии лизиса и сорбции ДНК. В этом случае:

- к материалу добавить 150 мкл лизирующего буфера
- термостатировать пробирку в течение 20 мин при 50°C, периодически помешивая.
- центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин
- отобрать надосадочную жидкость в чистую пробирку,
- термостатировать пробирку в течение 10 мин при 50°C, периодически помешивая.
- добавить к ней 20 мкл сорбента, термостатировать пробирку в течение 10 мин при 50°C и продолжать выделение с пункта 7.1.1.4.

7.1.2 Выделение ДНК из цист нематод с помощью буфера STE

7.1.2.1 Цисты нематод поместить в пробирки.

7.1.2.2 Добавить 50 мкл буфера STE, гомогенизировать.

7.1.2.3 Инкубировать 5 мин на кипящей водяной бане

7.1.2.4 Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.2.5 Надосадочную жидкость использовать для амплификации целевого фрагмента ДНК соответствующей нематоды.

7.1.3 Выделение РНК из растительного материала с помощью набора «ПРОБА-НК»

ВНИМАНИЕ! При планировании пробоподготовки необходимо зарезервировать одну пробирку для получения препарата отрицательного контрольного образца (ОК) путем «выделения РНК» из пробирки, не содержащей анализируемого материала, и дальнейшего проведения реакции обратной транскрипции.

Примечание: в лизирующем растворе допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65°C в течение 15-20 мин.

7.1.3.1. ~50 мг растительной ткани (кусочек листа) гомогенизировать в 400 мкл лизирующего раствора. Гомогенат перенести в пластиковую пробирку.

7.1.3.2. Термостатировать пробирку в течение 20 мин при 65°C.

7.1.3.3. Центрифугировать пробирку 10 мин при 2000 об/мин.

7.1.3.4. Аккуратно, не отбирая осадка, перенести надосадочную жидкость в чистую пластиковую пробирку. Добавить равный объем реагента для преципитации НК и перемешать на вортексе.

7.1.3.5. Центрифугировать пробирку 15 мин при 13000 об/мин.

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

7.1.3.7. Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирку на вортексе.

7.1.3.8. Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.

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

7.1.3.10. Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирку на вортексе.

7.1.3.11. Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.

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

7.1.3.13. Открыть крышку пробирки и высушить осадок в течении 5 мин при 65°C.

7.1.3.14. Добавить к осадку 50 мкл буфера для растворения НК, встряхнуть пробирку на вортексе в течение 5-10 сек.

7.1.3.15. Термостатировать пробирку в течение 5 мин при 65°C.

7.1.3.16. Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 13000 об/мин. Если образец предполагается хранить, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Препарат РНК готов для постановки реакции обратной транскрипции.

ВНИМАНИЕ! Ввиду нестабильности РНК рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции непосредственно после выделения. РНК можно хранить при -70° не более месяца.

7.1.4. Выделение ДНК из культур микроорганизмов с помощью «ПРОБА-РАПИД».

Данный ускоренный метод можно применять для быстрого выделения ДНК из бактериальных культур и нематод. При выделении ДНК из материалов, содержащих ингибиторы ПЦР, необходимо использовать набор «ПРОБА-ГС»

7.1.4.1. Перенести 100-500 мкл материала в пробирку пластиковую объёмом 1,5 мл.

Примечание. По возможности не допускать попадания постороннего материала в пробирку с реактивом, а также избытка материала в пробирке (при наличии избыточного материала рекомендуется разбавлять образец путём добавления дополнительно 100-200 мкл реактива «Проба-Рапид»).

7.1.4.2. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

7.1.4.3. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.4.4. Добавить к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного, перемешать.

7.1.4.5. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

7.1.4.6. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.4.7. Добавить к осадку 500 мкл реактива «Проба-Рапид» (содержимое одной пробирки), тщательно перемешать пипетированием, плотно закрыть крышку пробирки.

7.1.4.8. Встряхнуть пробирку «Проба-Рапид» с анализируемым образцом на микроцентрифуге/вортексе в течение 10 сек.

7.1.4.9. Термостатировать пробирку при 98°C в течение 10 мин. Термостат необходимо предварительно прогреть до 98°C. Пробирки должны быть плотно закрыты.

ВНИМАНИЕ! При прогревании пробирок возможно открывание крышек! Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой.

7.1.4.10. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 3 мин. В результате центрифугирования может образоваться осадок голубого цвета.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации. Полученный препарат ДНК можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток или при температуре -20°C не более 6 месяцев.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо выполнить пп. 7.1.4.8.-7.1.4.10. для отрицательного контрольного образца (новая пробирка с реактивом «Проба-Рапид» из комплекта реагентов для выделения ДНК).

Примечание. При ингибировании ПЦР (отсутствуют полосы специфического продукта и внутреннего контрольного образца при проведении электрофореза или отсутствует сигнал флуоресценции специфического продукта и внутреннего контрольного образца) необходимо повторно провести выделение ДНК. Для этого перенести 100 мкл надосадочной жидкости (п. 7.1.4.10.), содержащей выделенную ДНК, в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл и провести выделение ДНК при помощи комплекта реагентов «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика»).

7.2. Проведение реакции обратной транскрипции

7.2.1. Перед началом работы достать комплект реагентов для обратной транскрипции (ОТ) из морозильной камеры (за исключением обратной транскриптазы), разморозить содержимое пробирок при комнатной температуре, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

7.2.2. В отдельной пластиковой пробирке приготовить смесь ОТ (из расчета на одну пробу): к 2 мкл ОТ-буфера добавить 1 мкл суммы праймеров и 0,5 мкл обратной транскриптазы, тщательно перемешать на вортексе. При приготовлении смеси ОТ расчет проводить по количеству анализируемых образцов с учетом отрицательного контрольного образца (N) и запасом на одну пробу (N+1).

Примечание: обратную транскриптазу следует достать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3. Перенести пробирку со смесью ОТ в помещение, предназначенное для выделения РНК.

7.2.4. Промаркировать (N) чистых пластиковых пробирок.

7.2.5. Внести в соответствующие пробирки по 16,5 мкл препарата РНК, добавить по 3,5 мкл смеси ОТ.

Примечание: рекомендуется использовать наконечники с фильтром.

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

7.2.7. Инкубировать пробирки при температуре 40°C в течение 40 мин, а затем при температуре 95°C в течение 10 мин.

Примечание: Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой

7.2.8. Осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

7.2.9. Во все пробирки добавить по 80 мкл буфера для разведения кДНК, тщательно перемешать пробирки на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

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

ВНИМАНИЕ! Препарат кДНК хранить при -20°C.

7.3. Подготовка и проведение ПЦР

7.3.1. Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учетом пробирок для отрицательного («К-») и положительного («К+») контрольных образцов. При работе с наборами реагентов для ПЦР в формате FLASH необходимо дополнительно промаркировать две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.

Примечание. Пробирки для ПЦР в реальном времени нельзя маркировать на центральной части крышки, так как через нее происходит детекция сигнала.

7.3.2. При работе с набором реагентов для ПЦР в режиме реального времени необходимо предварительно создать протокол анализа с использованием программного обеспечения, поставляемого вместе с детектирующим амплификатором.

7.3.3. 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.

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

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

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

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

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

Примечание. В случае возникновения проблем с пробоподготовкой и проведением ПЦР рекомендуется дополнительно в одну из пробирок добавлять стерильную воду.

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

Примечание: При работе с наборами 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°C в течение 1 месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25°C), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7.3.9. Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин в течение 3-5 с для осаждения всех компонентов смеси на дно пробирки.

7.3.10. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР, с учетом объема реакционной смеси 35 мкл. Выбор программы амплификации осуществляется в соответствии с таблицей 1.

7.4. Регистрация результатов амплификации

7.4.1. Регистрация результатов амплификации в формате ПЦР в реальном времени.

При использовании детектирующего амплификатора с наборами реагентов для ПЦР в режиме реального времени детекция и анализ результатов проводится автоматически после завершения реакции программным обеспечением, поставляемым вместе с детектирующим амплификатором. При необходимости анализ результатов может проводиться вручную. При этом следует руководствоваться инструкцией к амплификатору.

7.4.1. Регистрация результатов амплификации в формате FLASH-ПЦР.

После окончания амплификации пробирки перенести в отдельное помещение для проведения детекции результатов ПЦР с помощью ПЦР-детектора «ДЖИН», 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.

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

7.4.1.2. В биологических образцах, содержащих ДНК анализируемого фитопатогена, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

7.4.1.3. В биологических образцах, не содержащих ДНК анализируемого фитопатогена, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

7.4.1.4. В случае отрицательного результата на наличие ДНК анализируемого фитопатогена и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

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

7.4.1.6. При получении положительного результата на наличие ДНК анализируемого фитопатогена для отрицательного контрольного образца («К-»), результаты всей постановочной серии выбраковывают. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Таблица 1. Длины продуктов и программы ПЦР-амплификации кДНК
(** – отдельные тест-системы на каждый вид)

Продукт ПЦР-амплификации	Длина детектируемого продукта, п.н.	Канал детекции () – для Corbett Rotor-Gene 6000	Программа амплификации					
			FLASH/форез	ДТ-96/ ДТ-322/ ДТпрайм/ ДТлайт	iCycler iQ	ABI 7500	Corbett Rotor- Gene 6000	CFX96
Сосновые древесные нематоды (<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , <i>B. mucronatus</i>)**	280	FAM (Green)	2	4	8	9	12	15
Кольцевая гниль картофеля (<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>)	136	FAM (Green)	3	5	6	10	13	16
Бактериальный ожог плодовых (<i>Erwinia amylovora</i>)	257	FAM (Green)	2	4	8	9	12	15
Бледная картофельная цистообразующая нематода (<i>Globodera pallida</i>)	136	FAM (Green)	3	5	6	10	13	16

Золотистая картофельная цистообразующая нематода (<i>Globodera rostochiensis</i>)	304	FAM (Green)	3	5	6	10	13	16
Буряя бактериальная гниль (<i>Ralstonia solanacearum</i>)	256	FAM (Green)	2	4	7	9	12	15
Бактериальный вилт кукурузы (<i>Pantoea stewartii</i> ssp. <i>stewartii</i>)	215	FAM (Green)	2	4	8	9	12	15
Плодовая средиземноморская муха (<i>Ceratitis capitata</i>)	300	FAM (Green)	11	11	-	-	14	17
Фомопсис подсолнечника (<i>Diaporthe helianthi</i> (<i>Phomopsis helianthi</i>))	331	FAM (Green)	2	4	8	9	12	15
Вирус шарки сливы	268	FAM (Green)	2	4	6	9	12	15
Андийский латентный вирус картофеля	300	FAM (Green)	2	4	-	9	12	15
Андийский вирус крапчатости картофеля	333	FAM (Green)	2	4	-	9	12	16
Ризомания сахарной свеклы	320	FAM (Green)	2	4	-	9	12	15
Вироид веретеновидности клубней картофеля	260	FAM (Green)	2	4	-	9	12	15
Вирус кольцевой пятнистости томата	200	FAM (Green)	-	18	-	-	19	18
Вирус кольцевой пятнистости табака	350	FAM (Green)	-	18	-	-	19	18
Вирус кольцевой пятнистости малины	350	FAM (Green)	-	18	-	-	19	18
Вирус чёрной кольцевой пятнистости картофеля	350	FAM (Green)	-	18	-	-	19	18
Внутренний контроль (тест-системы на FLASH/форез)	560	HEX (Yellow)	-	-	-	-	-	-

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов следует связаться с представителем компании для уточнения программы амплификации

Таблица 2. Режим амплификации для амплификатора «Терцик» алгоритм регулирования: «точный»

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин 30 сек	1
94°C	20сек	5
64°C	5сек	
67°C	5сек	
94°C	1сек	40
64°C	5сек	
67°C	5сек	
10°C	хранение	

Таблица 3. Режим амплификации для амплификатора «Терцик» алгоритм регулирования: «точный»

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин 30 сек	1
94°C	5 сек	5
67°C	15 сек	
94°C	1сек	40
67°C	15сек	
10°C	хранение	

Таблица 4. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт

Температура	Время	Количество циклов
80°C	30 с	1
94°C	1 мин 30 с	
94°C	30 с	5
64°C*	30 с	
94°C	10 с	45
64°C*	30 с	
10°C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 5. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт

Температура	Время	Количество циклов
80°C	30 с	1
94°C	1 мин 30 с	
94°C	30 с	5
67°C*	30 с	
94°C	10 с	45
67°C*	30 с	
10°C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 6. Формат «Real-time» Режим амплификации для iCycler iQ.

Температура	Время	Количество циклов
Режим dynamicwf.tmo		
80°C	30 с	1
94°C	1 мин 30 с	
94°C	30 с	5
67°C	45 с	
80°C *	30 с	2
Программа амплификации		
94°C	10 с	45
67°C *	45 с	

*- регистрация результатов

Таблица 7. Формат «Real-time» Режим амплификации для iCycler iQ

Температура	Время	Количество циклов
Режим dynamicwf.tmo		
80°C	30 с	1
94°C	1 мин	
94°C	20 с	10
64°C	30 с	
64°C *	20 с	2
Программа амплификации		
94°C	10 с	40
64°C*	20 с	
67°C	20	

*- регистрация результатов

Таблица 8. Формат «Real-time» Режим амплификации для iCycler iQ

Температура	Время	Количество циклов
Режим dynamicwf.tmo		
80°C	30 с	1
94°C	1 мин 30 с	
94°C	30 с	5
64°C	45 с	
80°C *	30 с	2
Программа амплификации		
94°C	10 с	45
64°C *	45 с	

*- регистрация результатов

Таблица 9. Формат «Real-time» Режим амплификации для ABI 7500

Температура	Время	Количество циклов
60°C*	1 мин	1
94°C	3 мин	1
94°C	20сек	
64°C*	30сек	40
60°C*	1 мин	1

*- регистрация результатов

Таблица 10. Формат «Real-time» Режим амплификации для 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Температура	Время	Количество циклов
60°C*	1 мин	1
94°C	3 мин	1
94°C	20сек	40
67°C*	30сек	
60°C*	1 мин	1

*- регистрация результатов

Таблица 11. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт. Формат «Форезз» для амплификатора Терцик.

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин	1
94°C	10 с	50
60°C *	15 с	
67°C	20 с	
10°C	хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 12. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000**

Температура	Время	Количество циклов
94°C	2 мин 00 сек	1
94°C	15 сек	50
60°C	5 сек	
64°C	45 сек*	

*- регистрация результатов

** - Threshold для всех каналов 0,04.

Таблица 13. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000**

Температура	Время	Количество циклов
94°C	2 мин 00 сек	1
94°C	15 сек	50
60°C	5 сек	
67°C	45 сек*	

*- регистрация результатов

** - Threshold для всех каналов 0,04.

Таблица 14. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000**

Температура	Время	Количество циклов
94°C	2 мин 00 сек	1
94°C	15 сек	50
60°C	30 сек	
67°C	30 сек*	

*- регистрация результатов

** - Threshold для всех каналов 0,04.

Таблица 15. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора BioRad CFX96

Температура	Время	Количество циклов
94°C	3 мин 00 сек	1
94°C	15 сек	45
64°C	45 сек*	

*- регистрация результатов

Таблица 16. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора BioRad CFX96

Температура	Время	Количество циклов
94°C	3 мин 00 сек	1
94°C	15 сек	45
67°C	45 сек*	

*- регистрация результатов

Таблица 17. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора BioRad CFX96*

Температура	Время	Количество циклов
94°C	3 мин 00 сек	1
94°C	15 сек	45
60°C	45 сек*	

*- регистрация результатов

Таблица 18. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/Дтпрайм/Дтлайт

Температура	Время	Количество циклов
94°C	60 с	1
94°C	10 с	45
55°C	20 с*	
72°C	10 с	
10°C	хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 19. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000**

Температура	Время	Количество циклов
94°C	300 с	1
94°C	30 с	45
55°C*	30 с	
72°C	10 с	
10°C	хранение	

*- регистрация результатов

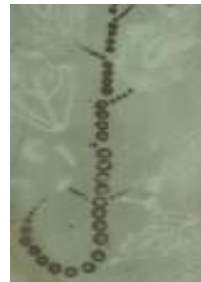
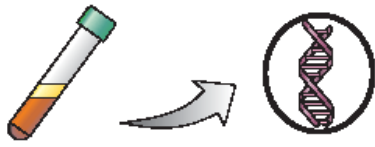
** - Threshold для всех каналов 0,04.

Заключение

Наборы, производимые компанией ООО «АгроДиагностика», соответствуют всем требованиям, применяемым к современным диагностическим системам: позволяют с высокой чувствительностью и специфичностью диагностировать соответствующие карантинные фитопатогены; применение флуоресцентной детекции результатов амплификации позволяет максимально автоматизировать и стандартизировать этапы анализа, а также сократить количество манипуляций в пределах каждого этапа. Диагностические наборы ООО «АгроДиагностика» могут быть рекомендованы к применению для нужд лабораторий, аккредитованных национальным органом по аккредитации на право проведения лабораторных исследований в области карантина растений в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Этапы определения фитопатогенов с помощью диагностических наборов
ООО «АгроДиагностика».

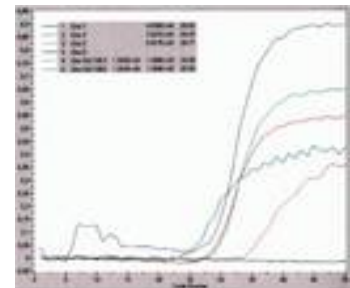
1. Выделение тотальной ДНК или РНК



1.1. Обратная транскрипция



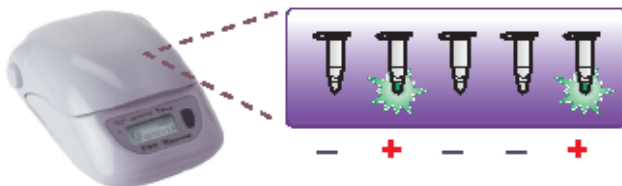
2. Полимеразная цепная реакция
с детекцией результатов в
режиме реального времени



2. Полимеразная
цепная реакция

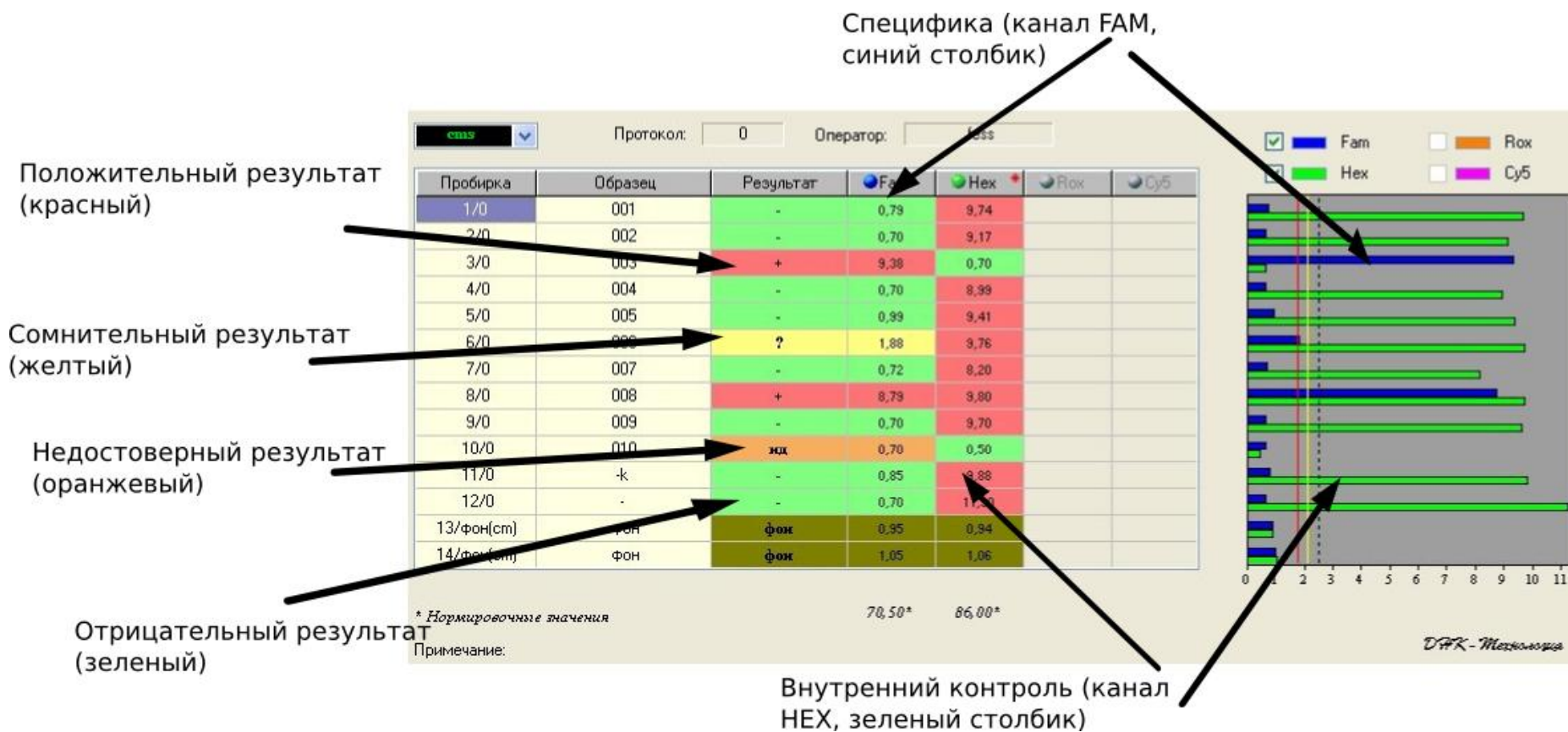


3. Детекция результатов в формате FLASH



Пример определения возбудителя кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) с использованием ПЦР-детектора «ДЖИН» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Зеленым цветом маркированы отрицательные результаты анализа (ДНК внутреннего контроля детектируется, а ДНК возбудителя рака томатов не детектируется), красным – положительные (детектируется как ДНК внутреннего контроля, так и возбудителя рака томатов), желтым – сомнительные (сигнал флуоресценции ДНК возбудителя рака томатов попадает в зону неопределенности результатов), оранжевым – недостоверные (ДНК внутреннего контроля не детектируется, также как и ДНК возбудителя рака томатов) результаты анализа.



Пример определения возбудителя кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»).

