

**Краткая инструкция к комплектам реагентов для проведения ПЦР-амплификации ДНК фитопатогенов (форматы «Форез», «Flash», «Real-Time»)**

**Состав (на 50 определений)**

Реактив	Количество	
Реакционная смесь, запечатанная парафином*	20 мкл	50 пробирок
Минеральное масло	1000 мкл	1 пробирка
Раствор Taq-полимеразы	500 мкл	1 пробирка
Положительный контрольный образец ДНК	75 мкл	1 пробирка
ПЦР-буфер**	200 мкл	1 пробирка

\* - для формата «Real-Time» пробирки могут быть заменены 6 стрипами по 8 пробирок. В этом случае общее число определений составляет 48.

\*\* - в комплекте реагентов для FLASH.

**Инструкция по применению**

**I. Постановка амплификации**

1. Промаркируйте пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (с учетом пробирок для положительного контрольного образца - «К+» и для отрицательного контрольного образца - «К-»).

Примечание. Пробирки для формата «Real-Time» нельзя подписывать на крышечке.

2. При использовании для учета результатов амплификации ПЦР-детектора (формат «Flash») промаркируйте дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фоновой флуоресценции.

3. Добавьте в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы. В пробирки, маркированные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера.

4. Добавьте в каждую пробирку по 20 мкл минерального масла, плотно закройте пробирки.

5. Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.

6. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»). В пробирки, маркированные «К-» и «ФОН», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку в пробирку, маркированную «К+», внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7. Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.

8. Установите все пробирки в амплификатор и проведите ПЦР в режиме, приведенном в таблице 1-11, с учетом объема реакционной смеси 35 мкл и модели амплификатора.

**II. Проведение детекции и учет результатов ПЦР-амплификации ДНК**

1. Формат «Форез»: результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (см. табл.2-3 и инструкцию для проведения гель-электрофореза).

2. Формат «Flash»: с помощью ПЦР-детектора «Джин» согласно инструкции к прибору или с помощью гель-электрофореза. (см. табл.2-3 и инструкцию для проведения гель-электрофореза). Пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10; для внутреннего контроля- 2,50).

3. Формат «Real-time»: на приборах ДТ-96/ДТ-322/Дтпрайм/ДТлайт («ДНК-Технология») или других (табл. 1) в соответствии с инструкциями к приборам.

Таблица 1. Длины продуктов ПЦР-амплификации ДНК (\*\*- отдельные тест-системы на каждый вид)

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пн/ канал детекции	Программа амплификации			
		FLASH/форез	ДТ-96/ ДТ-322/ Дтпрайм/ ДТлайт	iCycler iQ	ABI 7500
<b>Сосновые древесные нематоды</b> ( <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , <i>B. mucronatus</i> )**	280/FAM	2	4	8	9
<b>Бактериальный рак томатов</b> ( <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> )	180/FAM	2	-	-	9
<b>Кольцевая гниль картофеля</b> ( <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> )	136/FAM	3	5	6	10
<b>Бактериальный ожог плодовых</b> ( <i>Erwinia amylovora</i> )	257/FAM	2	4	8	9
<b>Водянистая гниль плодов</b> ( <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> )	314/FAM	2	-	-	9
<b>Бледная картофельная цистообразующая нематода</b> ( <i>Globodera pallida</i> )	136/FAM	3	5	6	10
<b>Золотистая картофельная цистообразующая нематода</b> ( <i>Globodera rostochiensis</i> )	304/FAM	3	5	6	10
<b>Аскохитоз</b> (грибы <i>Ascochyta/Didymella/Phoma</i> )	230/FAM	2	-	-	9
<b>Некроз сердцевины стебля томата</b> ( <i>Pseudomonas corrugata</i> )	240/FAM	2	4	8	9
<b>Буряя бактериальная гниль</b> ( <i>Ralstonia solanacearum</i> )	256/FAM	2	4	7	9
<b>Черная бактериальная пятнистость томатов</b> ( <i>Xanthomonas campestris</i> )	294/FAM	2	4	8	9
<b>Бактериальный вилт кукурузы</b> ( <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> )	215/FAM	2	4	8	9
<b>Септориоз злаков</b> ( <i>Septoria tritici</i> , <i>Stangospora</i> ( <i>Septoria</i> ) <i>nodorum</i> )**	250/FAM	2	4	8	9
<b>Угловатая пятнистость листьев</b> ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lacydmanis</i> )	162/FAM	2	5	8	9
<b>Фузариоз злаков - Fusarium graminearum</b>	335/FAM	2	4	8	9
<b>Фузариоз злаков - Fusarium culmorum</b>	333/FAM	2	4	8	9
<b>Фузариоз злаков - Fusarium sporotrichioides</b>	310/FAM	2	4	8	9
<b>Фузариоз злаков - Fusarium langsethiae</b>	306/FAM	2	4	8	9
<b>Фузариоз злаков - Fusarium poae</b>	299/FAM	2	4	8	9
<b>Фузариоз злаков - Fusarium avenaceum</b>	236/FAM	2	4	8	9
<b>Фузариоз злаков - Fusarium tricinctum</b>	235/FAM	2	4	8	9
<b>F. graminearum, F. culmorum</b> — токсины DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, FUSX, ZEA	410/FAM	2	4	8	9
<b>F. sporotrichioides, F. langsethiae</b> — токсины T-2, HT-2, DAS, NEO, ZEA	333/FAM	2	4	8	9
<b>F. poae</b> — токсины NIV, FUSX, T-2, HT-2, DAS, ZEA	188/FAM	2	4	8	9
<b>F. avenaceum, F. tricinctum</b> — токсины MON, BEA, ENN	289/FAM	2	4	8	9
<b>Фузариоз злаков - Fusarium cerealis</b>	300/FAM	11	11	-	-
<b>Плодовая средиземноморская муха - Ceratitis capitata</b>	300/FAM	11	11	-	-
<b>Фомопсис подсолнечника - Diaporthe helianthi (Phomopsis helianthi)</b>	331/FAM	2	4	8	9
<b>Гниль сахарной свёклы - Pseudomonas syringae</b>	170/FAM	2	4	8	9
<b>Возбудитель ржавчины гороха - Uromyces pisi (пара праймеров Up1)</b>	500/FAM	2	4	8	9
<b>Возбудитель ржавчины гороха - Uromyces pisi (пара праймеров Up2)</b>	450/FAM	2	4	8	9
<b>Внутренний контроль (тест-системы на FLASH/форез)</b>	560/HEX	-	-	-	-

**Внимание! При использовании других амплификаторов свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации**

**\*- регистрация результатов**

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	
67°C	15сек	40
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	5
94°C	30 с	
64°C*	30 с	
94°C	10 с	45
64°C*	30 с	Хранение
10°C		

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	5
94°C	30 с	
67°C*	30 с	
94°C	10 с	45
67°C*	30 с	Хранение
10°C		

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

Температура	Время	Количество циклов
Режим dynamicwcf.tmo		
80 С	30 с	1
94 С	1 мин 30 с	5
94 С	30 с	
67 С	45 с	
80 С *	30 с	2
Программа амплификации		
94 С	10 с	45
67 С *	45 с	хранение
10 С		

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

Температура	Время	Количество циклов
Режим dynamicwfm.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	
10 C	хранение	

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

Температура	Время	Количество циклов
Режим dynamicwfm.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	
10 C	хранение	

Таблица 9.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	
64°C*	30сек	40
60°C*	1 мин	1
10°C	хранение	

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	
67°C*	30сек	40
60°C*	1 мин	1
10°C	хранение	

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

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