

Краткая инструкция к комплектам реагентов для проведения ПЦР-амплификации ДНК фитопатогенов (форматы «Real-Time», Rotor-Gene 6000)

Состав (на 50 определений)

Реактив	Количество	
Реакционная смесь, запечатанная парафином	20 мкл	50 пробирок
Раствор Taq-полимеразы	500 мкл	1 пробирка
Положительный контрольный образец ДНК	150 мкл	1 пробирка

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-»).

2. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы.

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

4. Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.

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

6. Установите все пробирки в амплификатор и проведите ПЦР в режиме, приведенном в таблице 2, с учетом объема реакционной смеси 35 мкл.

II. Проведение детекции и учет результатов ПЦР-амплификации ДНК

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

• **Формат «Real-time».**

Для проведения ПЦР используют амплификатор Rotor-Gene (Corbett Research). Установите все пробирки в карусель амплификатора, наденьте прижимное кольцо. Проверьте, чтобы карусель была сбалансирована при работе прибора. Номера мест для пробирок в карусели будут соответствовать номерам образцов в программе амплификатора.

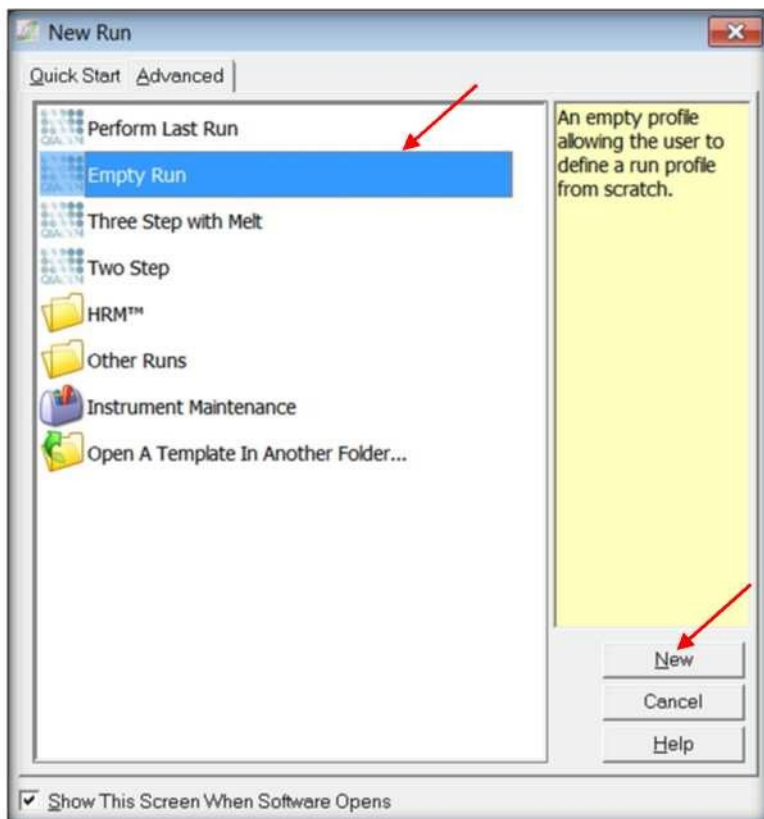
Запустите программное обеспечение. Для проведения ПЦР создайте и запустите новый файл.

Создание нового файла в программе амплификации необходимо производить в следующем порядке:

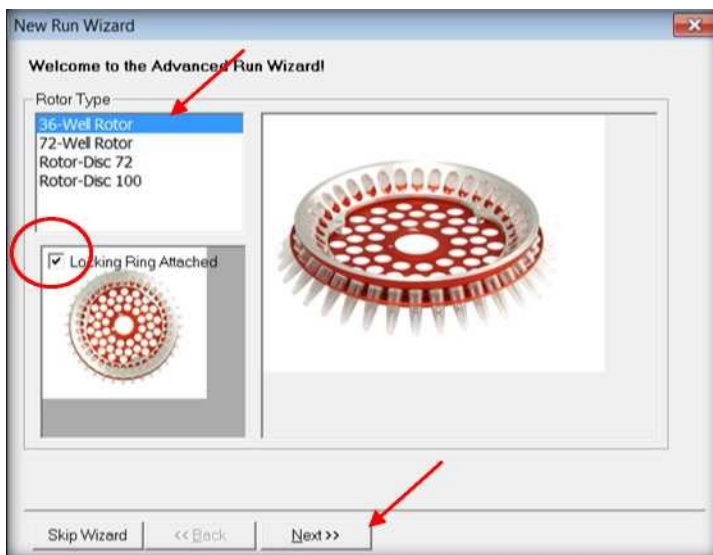
Откройте программу амплификации, нажмите кнопку «New» в основном меню программы.



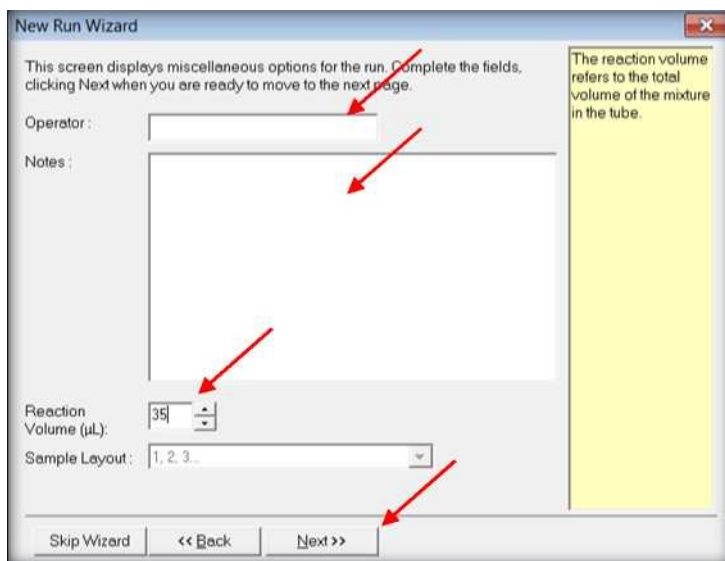
В появившемся окне выберите шаблон запуска «Advanced». Выделите «Empty Run», нажмите кнопку «New».



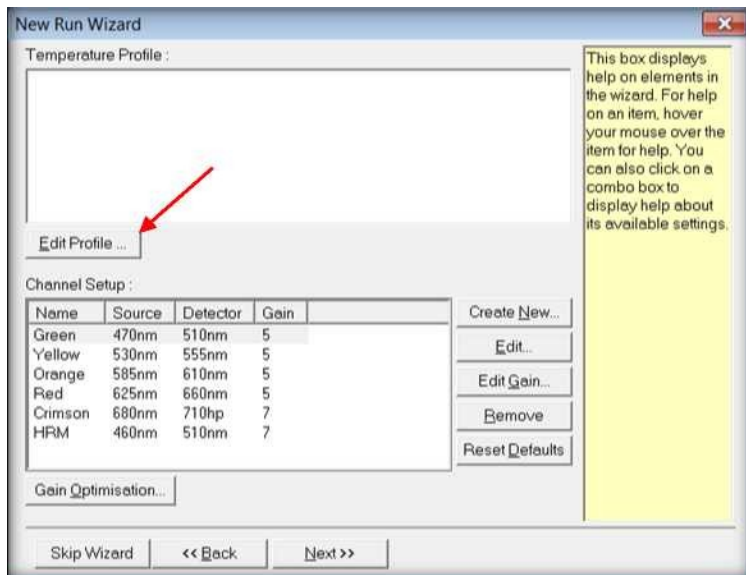
В открывшемся окне выберите 36-луночную карусель. Проверьте, чтобы прижимное кольцо было закреплено правильно, в противном случае его срыв может повредить прибор. Нажмите кнопку «Next».



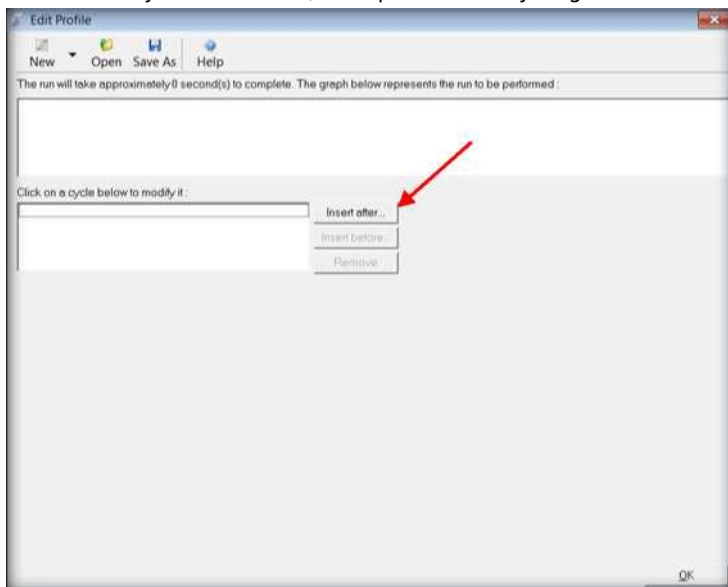
В открывшемся окне задайте имя оператора, описание эксперимента и объём реакционной смеси (35 мкл). Нажмите кнопку «Next».



В следующем окне создайте температурный профиль. Для этого нажмите кнопку «Edit Profile».



Нажмите кнопку «Insert after», выберите «New Cycling».



Создайте температурный профиль эксперимента (таблица 1-4).

Для этого с помощью «This cycle repeats» задайте количество циклов в соответствующем циклировании. Кнопками «+» или «-» можно добавлять или удалять температурные полки. Для редакции параметров температурных полок выделите мышкой соответствующий шаг и используйте кнопки «deg.» (градусы), «seconds» (время в секундах).

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

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пн/ канал детекции	Программа амплификации (Таблица №)
Бактериальный ожог плодовых (<i>Erwinia amylovora</i>)	257/FAM/Green	2
Кольцевая гниль картофеля (<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>)	136/FAM/Green	3
Бледная картофельная цистообразующая нематода (<i>Globodera pallida</i>)	136/FAM/Green	3
Золотистая картофельная цистообразующая нематода (<i>Globodera rostochiensis</i>)	304/FAM/Green	3
Буряя бактериальная гниль (<i>Ralstonia solanacearum</i>)	256/FAM/Green	2
Сосновые древесные нематоды (<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , <i>B.</i> <i>mucronatus</i>)**	280/FAM/ Green	2
Бактериальный вилт кукурузы (<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>)	215/FAM/ Green	2
Фомопсис подсолнечника – <i>Diaporthe helianthi</i> (<i>Phomopsis helianthi</i>)	331/FAM/Green	2
Плодовая средиземноморская муха – <i>Ceratitis capitata</i>	300/ FAM/Green	4
Внутренний контроль (тест-системы на FLASH/форез)	560/HEX/Yellow	

Таблица 2. 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*	
10°C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 3. Формат «Real Time»
Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

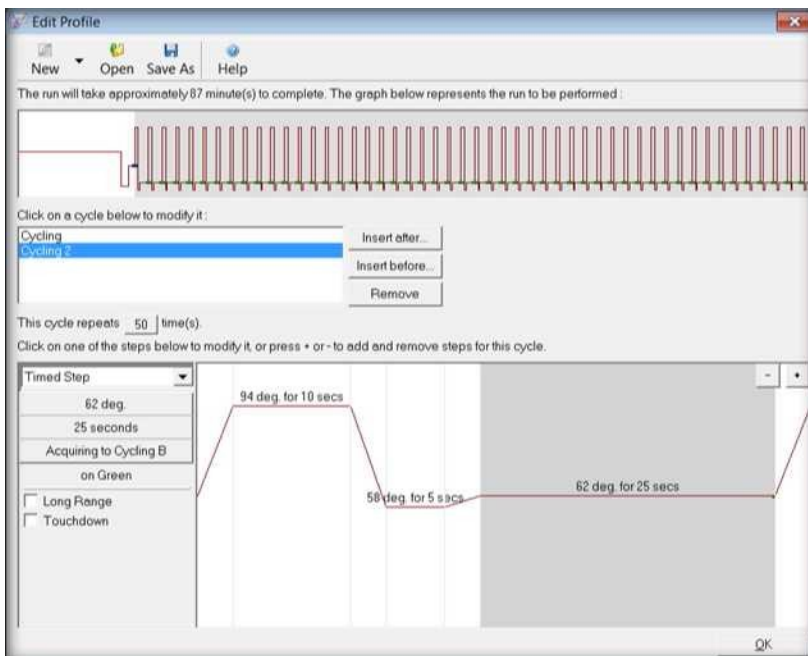
Температура	Время	Количество циклов
94°C	2 мин 00 сек	1
94°C	15 сек	50
60°C	5 сек	
67°C	45 сек*	
10°C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 4. 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*	
10°C	Хранение	

*- регистрация результатов



Для добавления канала детекции в соответствующем шаге нажмите кнопку «Not Acquiring» и стрелками переместите название нужных каналов «Green» и «Yellow» в правое окно. После выбора температурного профиля эксперимента нажмите кнопку «OK».

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition)

Acquisition Configuration :

Available Channels :

Name	>	<	<<	Name
Crimson				Green
HRM				
Orange				
Red				
Yellow				

To acquire from a channel, select it from the list in the left end click >. To stop acquiring from a channel, select it in the right-hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.

Dye Chart >>

OK Don't Acquire Help

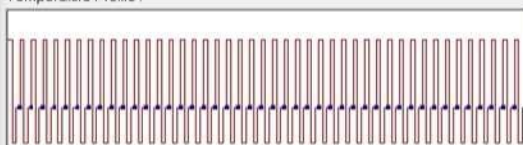
Dye Channel Selection Chart

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM ¹ , SYBR Green 1 ¹ , Fluorescein, EvaGreen ¹ , Alexa Fluor 488 ¹
Yellow	530nm	555nm	JOE ¹ , VIC ¹ , HEX, TET ¹ , CAL Fluor Gold 540 ¹ , Yakima Yellow ¹
Orange	585nm	610nm	ROX ¹ , CAL Fluor Red 610 ¹ , Cy3.5 ¹ , Texas Red ¹ , Alexa Fluor 568 ¹
Red	625nm	660nm	Cy5 ¹ , Quasar 670 ¹ , Alexa Fluor 633 ¹
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 ¹ , Alexa Fluor 680 ¹
HRM	460nm	510nm	SYTO 9 ¹ , EvaGreen ¹

В следующем окне нажмите кнопку «Gain Optimisation...»

New Run Wizard

Temperature Profile :



Edit Profile ...

Channel Setup :

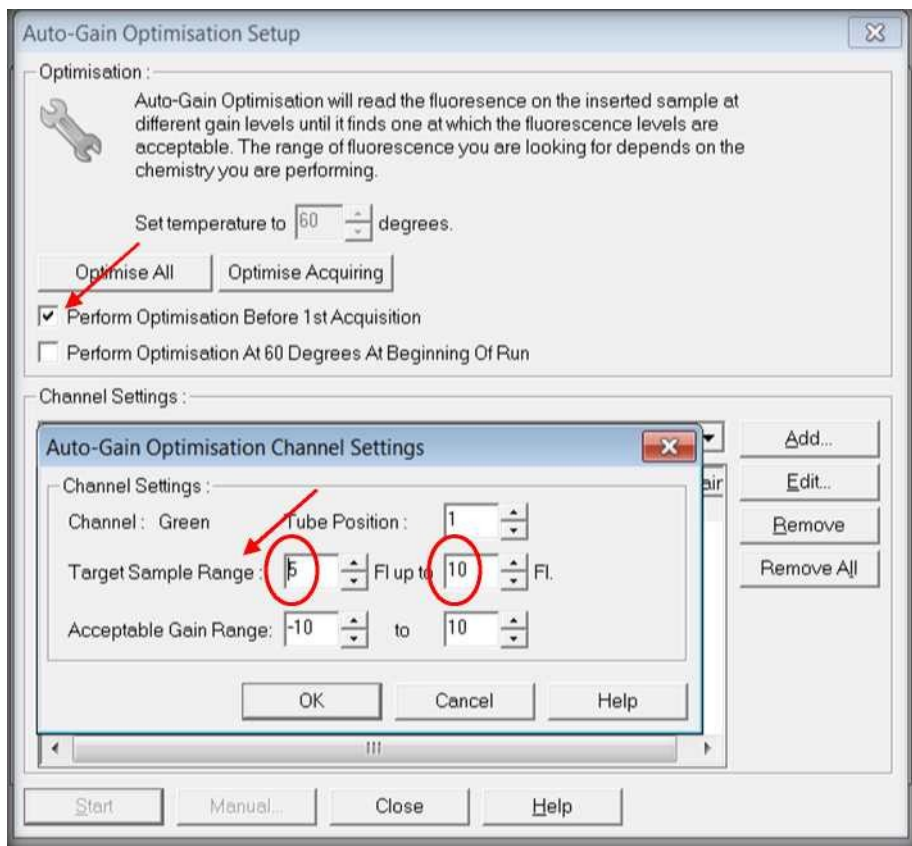
Name	Source	Detector	Gain
Green	470nm	510nm	5
Yellow	530nm	555nm	5
Orange	585nm	610nm	5
Red	625nm	660nm	5
Crimson	680nm	710hp	7
HRM	460nm	510nm	7

Gain Optimisation...

Skip Wizard << Back Next >>

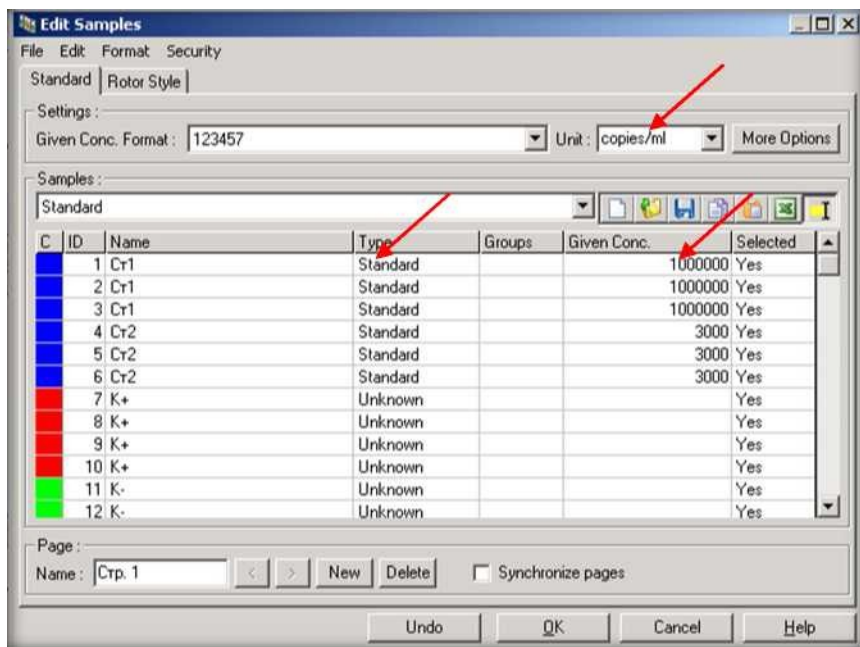
This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

В пункте меню «Channel Settings» выберите каналы «Green» и «Yellow». Установите «Tube Position» 1, «Target Sample Rang» 5 FI up to 10 FI. Установите галочку «Perform Calibration Before 1st Acquisition», нажмите «Close».



Нажмите кнопку «Next» и запустите амплификацию кнопкой «Start Run». Назовите файл и сохраните его на диске.

Примечание. В любое время работы с данным файлом возможно редактирование образцов. Номера пробирок в карусели амплификатора должны соответствовать номерам образцов в протоколе. Все клинические образцы, положительные и отрицательные контрольные образцы следует обозначать как «Unknown». Стандарты необходимо обозначать как «Standard». В графе «Given Conc.» следует указать концентрацию стандартов, выбрав размерность copies/ml.



Регистрация сигнала проводится прибором во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляются амплификатором автоматически.

Продукты амплификации специфических фрагментов ДНК детектируются по каналу «Green». Амплификация внутреннего контроля детектируется по каналу «Yellow».

Нажать на кнопку «Analysis» в основном меню программы.

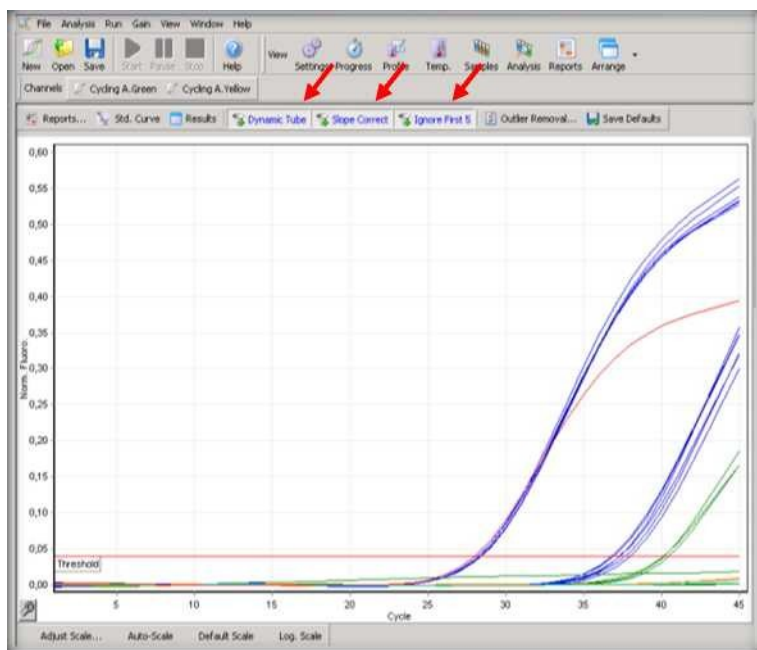
Для проведения анализа необходимо:



Выбрать «Cycling A Green», нажать «Show». Выбрать «Cycling A Yellow», нажать «Show».

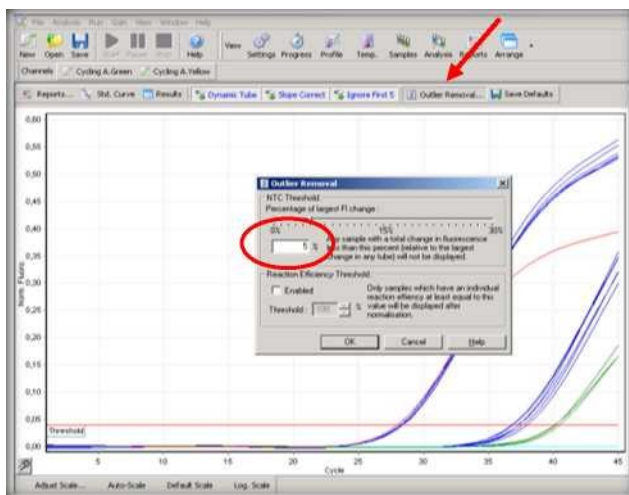


В меню основного окна нажать кнопки «Dynamic tube», «Slope Correct», «Linear Scale».

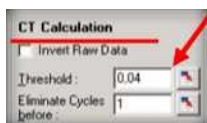


В меню «Ignore First» установить «5».

В меню «Quant. Removal» установить значение NTC threshold 5%.



Активировать окно «Cycling A Green». Установить Threshold для всех каналов 0,04. Активировать окно «Cycling A Yellow». Установить Threshold для всех каналов 0,04.



В таблице «Quant. Results» появятся значения Ct для каждого образца.