



Краткая инструкция к комплектам реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК фитопатогенных вирусов

(форматы «Форез», «Flash», «Real-Time»)

Состав (на 50 определений)

Комплект реагентов для обратной транскрипции (с данным набором не поставляется, приобретается отдельно)

Реактив	Количество	
Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ (ОТ-PPV+дНТФ)*	50 мкл	1 пробирка
Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
ОТ-Буфер	200 мкл	1 пробирка

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации

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

* - в комплекте реагентов на возбудителя шарки сливы.

** - для формата «Real-Time» пробирки могут быть заменены 6 стримами по 8 пробирок.

В этом случае общее число определений составляет 48.

***- в комплекте реагентов для FLASH.

Примечание: комплект реагентов для обратной транскрипции является универсальным для всех комплектов для ПЦР-амплификации, за исключением комплекта для ПЦР-амплификации кДНК вируса шарки сливы.

Инструкция по применению

Комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции и ПЦР-амплификации кДНК фитопатогенных вирусов рекомендуется использовать совместно с комплектом реагентов для выделения РНК «Проба-НК».

I. Постановка обратной транскрипции

1. Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 0,6 мл с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца «К-».
2. Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке 2,0x(N+1) мкл ОТ-буфера, 1,0x(N+1) мкл праймеров ОТ-RANDOM (ОТ-PPV)+дНТФ и 0,5x(N+1) мкл обратной транскриптазы, где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.
3. Внесите по 3,5 мкл ОТ-смеси в промаркированные пробирки.
4. Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.
5. Внесите по 16,5 мкл соответствующего образца РНК (кроме пробирки «К-») в пробирки с ОТ-смесью; в пробирку «К-» внесите отрицательный контрольный образец, прошедший этап выделения РНК.
6. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
7. Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
8. Термостатируйте пробирки при 40°C в течение 40 мин, затем инактивируйте обратную транскриптазу прогреванием при 95°C в течение 10 мин.
9. Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
10. Во все пробирки внесите по 80 мкл буфера для растворения из комплекта реагентов для выделения РНК «НК-Агро».
11. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
12. Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
13. Полученный препарат кДНК готов к внесению в пробирки со смесью для амплификации. Для каждого препарата кДНК возможно проведение исследования на наличие кДНК нескольких фитопатогенных вирусов. Для исследования на наличие кДНК каждого фитопатогенного вируса необходимо применять соответствующий комплект для ПЦР-амплификации кДНК.

II. 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. *Пробирка для формата «Real-Time» нельзя подписывать на крышечке.*
2. При использовании для учета результатов амплификации ПЦР-детектора «Джин» (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 кДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»). В пробирки, маркированные «К-» и «ФОН», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку и реакцию обратной транскрипции, 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 таблицах 2-5, с учетом объема реакционной смеси 35 мкл и модели амплификатора.

III. Проведение детекции и учет результатов ПЦР-амплификации кДНК

1. **Формат «Форез»:** результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (см. табл.2 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 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»), ABI 7500 или iCycler iQ, CFX96 (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями к приборам.

Таблица 1. Длины продуктов ПЦР-амплификации и программа амплификации

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пн	Программа амплификации			
		FLASH /форез	ДТ-96/ ДТ-322/ ДТпрайм/ДТлайт/ АНК-32	CFX96	ABI 7500
Вирус скручивания листьев картофеля	260/FAM	2	3	7	4
Вирус метельчатости верхушки картофеля	264/FAM	2	3	7	4
А вирус картофеля	221/FAM	2	3	7	4
М вирус картофеля	160/FAM	2	3	7	4
S вирус картофеля	278/FAM	2	3	7	4
X вирус картофеля	167/FAM	2	3	7	4
Y вирус картофеля	241/FAM	2	3	7	4
Вироид веретеновидности клубней картофеля	260/FAM	2	3	7	4
Актин картофеля	300/FAM	2	3	7	4
Ризомания сахарной свеклы (Beet necrotic yellow vein virus)	320/FAM	2	3	7	4
Вирус шарки сливы Plum pox potyvirus	268/FAM	2	3	7	4
Андийский латентный вирус картофеля	300/FAM	2	3	7	4
Андийский вирус крапчатости картофеля	333/FAM	2	3	7	4
Вирус чёрной кольцевой пятнистости картофеля	366/FAM	-	5	5	9
Вирус кольцевой пятнистости табака	372/FAM	-	5	5	9
Вирус кольцевой пятнистости томата	325/FAM	-	5	5	9
Вирус кольцевой пятнистости малины	332/FAM	-	5	5	9
Вироид латентной мозаики персика	274/FAM	-	5	5	9
Вирус жёлтой курчавости листьев томата *	229/FAM	-	6	8	10
Вирус некротической пятнистости бальзамина	251/FAM	-	5	5	9
Вирус бронзовости томата	239/FAM	-	5	5	9
Внутренний контроль (тест-системы на FLASH/форез)	560/HEX	-	-	-	-

* - ДНК-вирус, этап обратной транскрипции не нужен.

Условия хранения

Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции следует хранить при минус 20°C в течение всего срока годности.

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК следует хранить в темном месте при 2-8°C в течение всего срока годности.

Таблица 2. Форматы «Flash» и «Форез»

Режим амплификации для амплификатора «Терцик» алгоритм регулирования: «точный»

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин	1
94°C	20 с	5
64°C	5 с	
67°C	5 с	
94°C	1 с	40
64°C	5 с	
67°C	5 с	
10°C	Хранение	

Таблица 3. Формат «Real-Time»

Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт/АНК

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	

Таблица 4. Формат «Real-Time»

Режим амплификации для Applied Biosystems 7500

Температура	Время	Количество циклов
60°C	1 мин	1
94°C	1 мин 30 с	1
94°C	20 с	45
64°C*	30 с	
60°C	1 мин	1
10°C	Хранение	

Таблица 5. Формат «Real-Time»

Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт/АНК/CFX96

Температура	Время	Количество циклов
94°C	2 мин	1
94°C	15 с	45
55°C*	20 с	
72°C	10 с	
10°C	Хранение	

Таблица 7. Формат «Real - Time». Режим амплификации для амплификатора BioRad CFX96

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

*- регистрация результатов

Таблица 6. Формат «Real-Time»

Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт/АНК

Температура	Время	Количество циклов
94°C	2 мин	1
94°C	15 с	45
60°C*	20 с	
72°C	15 с	
10°C	Хранение	

Таблица 8. Формат «Real-Time» Режим амплификации для
ДТ-96/ДТ-322 /ДТпрайм /ДТлайт/ BioRad CFX96

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин	1
94°C	10 с	45
60°C*	15 с	
64°C	20 с	

* – регистрация результатов

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	20 с	40
55°C*	15 с	
72°C	20 с	
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	20 с	40
60°C*	15 с	
72°C	20 с	
60°C*	1 мин	1

* – регистрация результатов