

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ФИТОПАТОЛОГИИ**

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ имени
АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

**Диагностика токсигенных возбудителей фузариоза зерна
методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной
детекцией результатов с использованием наборов производства**

ООО «АгроДиагностика»

(Методические указания)

Москва

2012 г.

Методические указания подготовлены на основе исследований, проведённых научными коллективами ВНИИ Фитопатологии РАСХН¹, ООО «Агродиагностика»² и Института Биоорганической Химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН³, в составе: А.А. Стахеев³, к.б.н. Д.Ю. Рязанцев^{2,3}, проф., чл.-корр. РАСХН С.К. Завриев³, к.б.н. Л.А. Щербакова¹, к.б.н. Т.М. Коломиец¹.

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены Ученым Советом ВНИИ фитопатологии РАСХН 18 апреля 2012 года, протокол №11

Рецензент – д.б.н. А.Н. Игнатов

Методические рекомендации предназначены для специалистов-фитопатологов, агрономов, и специалистов, занимающихся выращиванием зерновых культур, хранением зерна и мониторингом зерна и продуктов его переработки на наличие микотоксинов и их продуцентов.

Введение

Фузариоз зерновых является одним из самых опасных заболеваний сельскохозяйственных культур по всему миру, в том числе и в различных природно-географических зонах России. Представители рода *Fusarium* поражают широкий круг сельскохозяйственных растений: ячмень, пшеницу, рожь, овёс, кукурузу, рис и др. Следствием заражения являются существенные потери урожая, снижение качества зерна, а также накопление в нём микотоксинов, представляющих серьёзную опасность для здоровья человека и животных. Вредоносность заболевания определяется, главным образом, агрессивностью патогенов и спектром продуцируемых ими токсинов.

Образование токсинов носит выраженный видоспецифичный характер. Наиболее обширной группой токсинов являются трихотецены, представляющие собой сесквитерпеноидные соединения, интоксикация которыми приводит к поражению желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой и нервной систем. Трихотеценовые токсины ингибируют биосинтез белка в эукариотических клетках, индуцируют хромосомные изменения. Потребление зернопродуктов, контаминированных трихотеценами, приводит к развитию тяжёлых заболеваний, таких как алиментарно-токсическая алейкия, эпидемия которой стала причиной гибели тысяч людей в центральной России в 30-40 годах XX века. В зависимости от химической структуры, трихотецены подразделяют на 2 типа: тип А, к которому относятся токсины Т-2, НТ-2, диацетоксисципренол (ДАС), и тип В, включающий дезоксиниваленол (ДОН), его ацетильные производные – 3-ацДОН и 15-ацДОН, ниваленол – (НИВ), и 4-ацетилниваленол (4-ацНИВ, или фузаренон Х). Продукентами трихотеценов типа А, которые считаются более токсичными для теплокровных, являются виды *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*. Образование трихотеценов типа В характерно для *F.*

graminearum, *F. culmorum*, *F. cerealis*. Вид *F. poae* способен продуцировать как А-, так и В-трихотецены.

Трихотеценообразующие виды *Fusarium* также способны к синтезу зеараленона, обладающего мутагенным, тератогенным (эмбриотоксическим) и канцерогенным действием, он может быть причиной раннего полового созревания и изменения вторичных половых признаков.

Среди распространенных видов, не продуцирующих трихотецены, наиболее опасны *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*. Для них характерно образование монилиформина, ингибитора пируватдегидрогеназного комплекса, а также энниатинов и боверицина – циклических депсипептидов, индуцирующих процессы апоптоза, и оказывающих отрицательные инотропный и хронотропный эффекты.

Важно отметить, что при закладке на хранение зерна микотоксины могут не выявляться, однако их продуцирование может начаться под воздействием биотических и абиотических стрессов при изменении условий хранения. В связи с этим необходима точная идентификация патогена, позволяющая предсказать, накопление каких токсинов возможно в конкретной партии зерна. Учитывая широкое распространение возбудителей фузариоза и представляемую ими опасность, существует необходимость постоянного мониторинга заражённости зерна этими патогенами. Микробиологические методы анализа весьма трудоёмки и не позволяют диагностировать заболевание, протекающее в латентной форме. Поэтому для быстрой и специфичной диагностики возбудителей фузариоза широко используются молекулярные подходы, в первую очередь основанные на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и её модификациях.

Компанией ООО «Агродиагностика» разработаны наборы для определения наиболее распространенных токсигенных возбудителей фузариоза зерна. Наборы основаны на методе ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов, и дают возможность быстрой, чувствительной и высокоспецифичной диагностики, позволяющей выявлять партии

зараженного зерна и проводить выбраковку семенного материала, проводить анализ продуктов питания, а также подбирать состав и количества фунгицидов для обработки семян.

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания содержат описания методов детекции следующих грибов-возбудителей фузариоза зерна:

1.1.1. Системы для видоспецифичного определения возбудителей фузариоза:

- *Fusarium graminearum*
- *F. culmorum*
- *F. sporotrichioides*
- *F. langsethiae*
- *F. poae*
- *F. avenaceum*
- *F. tricinctum*
- *F. cerealis*

1.1.2. Системы для определения групп видов со специфичными спектрами продуцируемых микотоксинов:

- Продуценты трихотеценовых токсинов типа А (*F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*);
- Продуценты трихотеценовых токсинов типа В (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*);
- Продуцент трихотеценовых токсинов «смешанного» хемотипа *F. poae*;
- Продуценты энниатинов (не продуцирующие трихотеценовые токсины) *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*.

1.2. Диагностика осуществляется с использованием наборов производства ООО «Агродиагностика» методом ПЦР. При использовании данных наборов возможны два способа детекции результатов амплификации: детекция в ходе реакции методом ПЦР «в реальном времени» (ПЦР-РВ),

либо детекция в формате гель-электрофореза. Способ детекции с помощью электрофореза не рекомендуется для использования ввиду опасности появления контаминации рабочей зоны и образцов.

1.3. Методические указания предназначены для нужд лабораторий и организаций, занимающихся анализом зерна и продуктов его переработки.

1.4. Методические указания могут применяться для контроля качества семенного материала, используемого для переработки и закладываемого на хранение и осуществления своевременной диагностики возбудителей фузариоза в процессе выращивания злаковых культур.

2. Нормативные ссылки

Official Journal of the European Union. Commission regulation (EC) No 856/2005 of 6 June 2005. Commission regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006.

ГОСТ 13586.3-83. Зерно. Правила приёмки и методы отбора проб.

ГОСТ 12044-93. Семена сельскохозяйственных культур, методы определения зараженности болезнями.

ГОСТ Р 52337-2005. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.

ГОСТ 10444.12-88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов.

ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

ГОСТ 26972-86. Зерно, крупа, мука, толокно для продуктов детского питания. Методы микробиологического анализа.

Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 6 ноября 2001 г.) (с изменениями от 31 мая 2002 г., 20 августа 2002 г., 15 апреля 2003 г.).

3. Принцип метода

Метод выявления грибов рода *Fusarium* в растительном и семенном материале с помощью диагностических наборов ООО «Агродиагностика» основан на использовании ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в ходе реакции (ПЦР-РВ) для выявления наличия ДНК фитопатогена.

3.1. Этапы проведения анализа образцов зерна

Детекция присутствия возбудителей фузариоза с помощью диагностических наборов ООО «Агродиагностика» состоит из следующих этапов:

3.1.1. Отбор проб анализируемого образца и формирование средней пробы в соответствии с действующими нормативными документами.

3.1.2. Выделение тотальной ДНК из исследуемых образцов мицелия с использованием набора реagens «Проба-ГС».

3.1.3. Выявление присутствия ДНК интересующего вида с помощью соответствующего набора в соответствии с инструкцией по применению.

3.1.4. Детекция результатов амплификации в формате ПЦР-РВ в ходе реакции с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология»), либо с помощью гель-электрофореза.

3.2. Этапы проведения анализа образцов зерна

3.2.1. Отбор образцов листовой ткани для анализа.

3.2.2. Выделение тотальной ДНК из исследуемых образцов мицелия с использованием набора реagens «Проба-ГС».

3.2.3. Выявление присутствия ДНК интересующего вида с помощью соответствующего набора в соответствии с инструкцией по применению.

3.2.4. Детекция результатов амплификации в формате ПЦР-РВ в ходе реакции с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология»), либо с помощью гель-электрофореза.

4. Требования к помещениям и техника безопасности

4.1. Общие требования

Общее расположение лаборатории, а также её инфраструктура должны соответствовать требованиям Методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.2. Правила работы с диагностическими наборами и оборудованием

4.2.1. Потенциальный риск применения набора относится к классу 2а (ГОСТ Р 51609).

4.2.2. Меры предосторожности при работе с наборами требуют соблюдения «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.).

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

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

4.2.5. 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.

4.2.6. На всех этапах диагностики необходимо использовать только новые наконечники и пробирки, не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.2.7. Выделение нуклеиновых кислот следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с включенным ламинарным током воздуха.

4.2.8. Для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК и проведения ПЦР следует осуществлять в разных помещениях или строго изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими необходимыми материалами.

4.2.9. Всё используемое лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и т.д., а также растворы реагентов, должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

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

4.2.11. Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно облучать бактерицидными облучателями как до, так и после окончания работы.

5. Оборудование, материалы и реактивы

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1794-03.

5.1. Оборудование и материалы:

- ДНК амплификатор «Терцик», детектирующий амплификатор ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология»);

При работе с наборами реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- Детектирующий амплификатор ДТ-96 производства ООО «НПО ДНК-технология»;
- фарфоровые ступки и пестики или пластиковые пестики-гомогенизаторы для пробирок Эппендорф;

- центрифуга для 1.5 мл пробирок со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- центрифуга для 15-50 мл пробирок со скоростью вращения ротора 5000 об/мин;
- термостат твердотельный и водяная баня, поддерживающие температуру 40...95°C;
- микроцентрифуга/вортекс (при работе со стрипами необходим специальный ротор);
- водоструйный насос с колбой-ловушкой;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объёмом 1.5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 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 объёмом 1-20 мкл;
- пробирки типа Эппендорф на объем 1.5 мл;
- фальконы объёмом 15 и 50 мл;
- одноразовые перчатки резиновые;
- 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).

При детекции методом электрофореза:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;

- колба мерная вместимостью 1 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1 мм.

5.2. Реактивы

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

- Лизирующий раствор, 1 флакон (15 мл);
- Сорбент, 1 флакон (2 мл);
- Промывочный раствор №1, 1 флакон (20 мл);
- Промывочный раствор №2, 1 флакон (20 мл);
- Промывочный раствор №3, 1 флакон (20 мл);
- Элюирующий раствор, 1 флакон (10 мл).

5.2.2. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК на 50 реакций, включающий:

- Амплификационная смесь, запечатанная парафином, 50 мкл по 20 мкл;
- Минеральное масло;
- Раствор Таq-полимеразы, 1 пробирка (500 мкл);
- Положительный контрольный образец ДНК, 1 пробирка (150 мкл).

Смесь для амплификации, запечатанная парафином, включает:

ПЦР-буфер, дезоксинуклеотидтрифосфаты, флуоресцентные ДНК-зонды, праймеры, образец внутреннего контроля.

6. Отбор, хранение и подготовка образцов для анализа

Все приготовления должны быть проведены в стерильных условиях для того, чтобы избежать контаминирования объекта изучения посторонней микрофлорой, а также загрязнения окружающей среды спорами культуры. Недопустимо рассеивание спор в окружающую среду: при манипуляциях с культурами грибов нельзя держать чашки Петри долгое время открытыми и в

это время активно вентилировать воздух. Микробиологические иголки и петли после использования необходимо прокалывать над пламенем горелки, микропрепараты держать в стерилизующем растворе, все материалы, загрязненные грибами, стерилизовать после употребления.

Из среднего образца взять 100-150 зерен и промаркировать. Для удаления поверхностной заспоренности проводят тщательную стерилизацию поверхности зерна. Затем тщательно промывают проточной водой, вначале с добавлением любого моющего средства (ПАВ), затем без него. Это позволяет смыть примеси. Вся стерилизуемая поверхность ткани должна быть смочена водой, поэтому необходимо контролировать на ней отсутствие пузырьков воздуха.

В зависимости от размера в одну чашку Петри с питательной средой (картофельно-глюкозный агар) помещают для анализа 5-10 зерен на одинаковом расстоянии друг от друга. Поскольку многие грибы активно растут и образуют активный воздушный мицелий, то в питательную среду добавляют вещества, ограничивающие скорость линейного роста и при этом не влияющие на структуру исследуемых объектов. К таким веществам относится тритон (Triton X-100), добавляемый, как правило, в состав стерильного раствора перед разливом среды в чашки или в колбу со средой перед автоклавированием.

Чашки Петри с исследуемыми образцами инкубируют при температуре 23-25°C 5-7 суток. Затем колонии грибов, выросших вокруг зерновок, используют для выделения ДНК и/или отсевают в пробирки с «косяком» питательной агаризованной среды или в новые чашки Петри.

7. Порядок проведения анализа

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

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

- При выделении ДНК из мицелия гриба или растительной ткани достаточно в 50 мкл лизирующего буфера набора «Проба-ГС» гомогенизировать образец размером ~ 2x2x2 мм (если мицелий легкий и воздушный, то необходимо брать больше). При этом в зависимости от обводненности ткани, необходимо регулировать количество буфера для гомогенизации таким образом, чтобы при этом получилась жидкая, а не желеобразная суспензия.
- Для выделения ДНК из зерна рекомендуется протокол: Official Journal of the European Union. Commission regulation (EC) No 856/2005 of 6 June 2005. Commission regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006.

7.1.1. Для обработки нескольких (N) образцов смешайте в отдельной пробирке 150x(N+1) мкл лизирующего раствора и 20x(N+1) предварительно ресуспендированного сорбента.

7.1.2. Добавьте по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом и встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.3. Термостатируйте пробирку в течение 20 мин при 50°C.

7.1.4. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.5. Удалите надосадочную жидкость.

7.1.6. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.7. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.8. Удалите надосадочную жидкость.

7.1.9. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.10. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

- 7.1.11. Удалите надосадочную жидкость.
- 7.1.12. Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.
- 7.1.13. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.1.14. Удалите надосадочную жидкость.
- 7.1.15. Откройте крышку пробирки и термостатируйте пробирку при 50°C в течении 5 мин.
- 7.1.16. Добавьте к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхните пробирку на вортексе в течение 5-10 сек.
- 7.1.17. Термостатируйте пробирку при 50°C в течение 5 мин.
- 7.1.18. Центрифугируйте пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин. Если образец предполагается хранить, перенесите 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; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50°C в течение 15-20 мин.

7.2. Подготовка и проведение ПЦР

7.2.1. Необходимо промаркировать пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации, с учётом пробирок для отрицательного контрольного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

7.2.2. Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

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

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

7.2.5. Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5 мкл выделенного из образца препарата ДНК (за исключением пробирок «К+», «К-»). Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.2.6. 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.

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

7.2.8. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в следующих режимах, приведённых для амплификаторов с активным регулированием, с учётом объёма реакционной смеси 35 мкл (Табл. 1-3).

Таблица 1. Температура отжига, размер амплифицируемых фрагментов и каналы детекции результатов ПЦР.

Объект	Размер амплифицируемого фрагмента п.н./канал детекции	Температура отжига (Tm)
<i>Fusarium graminearum</i>	335/FAM	64
<i>Fusarium culmorum</i>	333/FAM	64
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	310/FAM	64
<i>Fusarium langsethiae</i>	306/FAM	64
<i>Fusarium poae</i>	299/FAM	64
<i>Fusarium avenaceum</i>	236/FAM	64
<i>Fusarium tricinctum</i>	235/FAM	64
<i>F. graminearum, F. culmorum</i> — токсины DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, FUSX, ZEA	410/FAM	64
<i>F. sporotrichioides, F. langsethiae</i> — токсины T-2, HT-2, DAS, NEO, ZEA	333/FAM	64
<i>F. poae</i> — токсины NIV, FUSX, T-2, HT-2, DAS, ZEA	188/FAM	64
<i>F. avenaceum, F. tricinctum</i> — токсины MON, BEA, ENN	289/FAM	64
Фузариоз злаков - <i>Fusarium cerealis</i>	300/FAM	60
Внутренний контроль	560/HEX	-

Таблица 2. Режим проведения ПЦР с использованием амплификатора «Терцик»:

№п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1	93°C	90 с	1
2	93°C	20 с	5
	Tm°C 67°C	5 с 5 с	
3	93°C	1 с	40
	64°C	5 с	
	67°C	5 с	
4	10°C	хранение	

Таблица 3. Режим проведения ПЦР с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96:

№п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1	94°C	10 с	45
	Tm°C*	15 с	
	67°C	10 с	
2	10°C	хранение	

* - детекция результатов

7.4. Детекция результатов амплификации

7.4.1. Детекция результатов амплификации в формате геле-электрофореза.

7.4.1.1. Электрофорез проводят в 2,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия по стандартным протоколам. Визуализацию проводят на трансиллюминаторе УФ света (312 нм).

7.4.1.2. Для образцов, содержащих ДНК грибов рода *Fusarium* должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, на уровне полосы положительного контрольного образца ДНК, соответствующая продукту

амплификации фрагмента ДНК (таблица 1). Наличие или отсутствие полосы ДНК внутреннего контроля в этом случае в учет не принимают (Рис. 1).

7.4.1.3. Для образцов, не содержащих ДНК грибов рода *Fusarium*, в том числе в отрицательном контрольном образце, полоса оранжево-красного цвета, соответствующая продукту амплификации фрагмента ДНК (таблица 1) должна отсутствовать, при этом полоса ДНК внутреннего контроля размером 560 п.н. должна быть отчетливо видна (Рис. 1).

7.4.1.3. В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей продукту амплификации фрагмента ДНК грибов рода *Fusarium* (таблица 1) и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контролю размером 560 п.н. результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

7.4.1.4. В случае наличия полосы, оранжево-красного цвета, соответствующая длине продукта амплификации фрагмента ДНК (таблица 4), в отрицательном контрольном образце («К-»), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

7.4.2. Регистрация результатов амплификации в формате ПЦР «в реальном времени».

7.4.2.1. При использовании детектирующего амплификатора с наборами реагентов для ПЦР в режиме «реального времени» детекция и анализ результатов проводятся 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.

7.4.2.1. В биологических образцах, содержащих ДНК грибов рода *Fusarium*, программа фиксирует положительный результат. Результат

амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается (Рис. 2).

7.4.2.2. В биологических образцах, не содержащих ДНК грибов рода *Fusarium*, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

7.4.2.3. В случае отрицательного результата на наличие ДНК грибов рода *Fusarium* и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

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

7.4.2.5. При получении положительного результата на наличие ДНК грибов рода *Fusarium* для отрицательного контрольного образца («К-»), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Рисунок 1. Пример определения возбудителя фузариоза зерна (вид *F. culmorum*) методом гель-электрофореза. Образцы ДНК: 1-4 – *F.graminearum*; 5-7 – *F.culmorum*; 8-10 – *F.sporotrichioides*; 11-15 – *F.tricinatum*; 16-20 – *F.poaе*; 22-26 – *F.avenaceum*; 21,27 – *F.langsethiae*. М – маркер молекулярных весов, «-К» - отрицательный контроль.

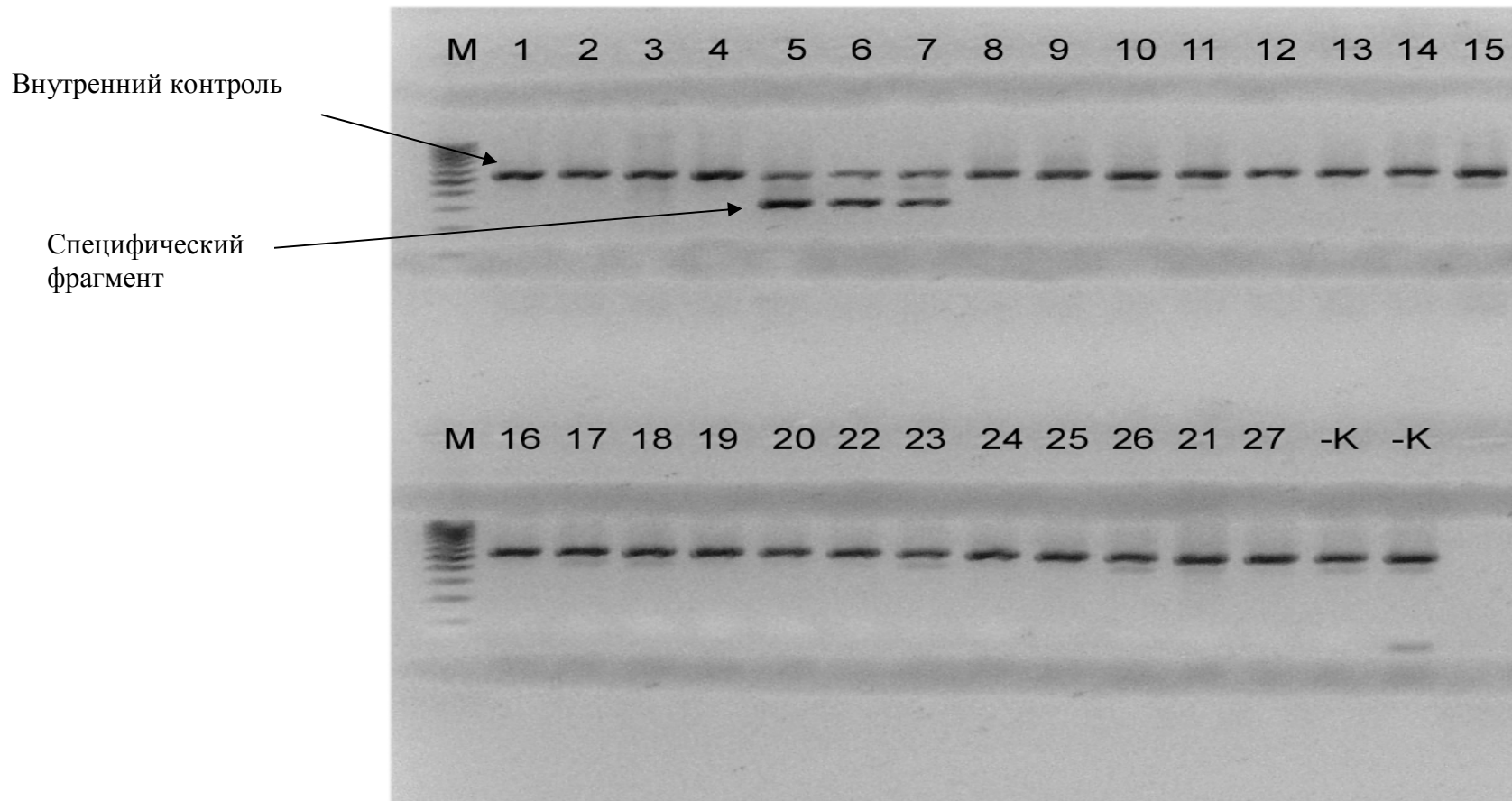


Рисунок 2. Пример определения токсигенного гриба *F. cerealis* с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология»)

