

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

Реактив	Состав (на 50 определений)	
	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. Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.
4. 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.
5. 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.

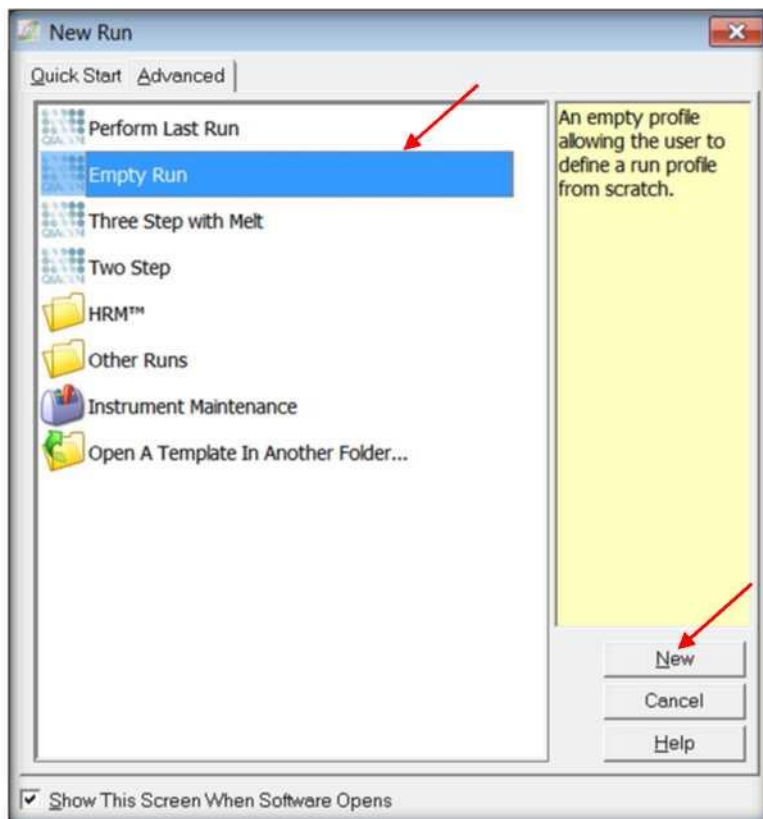
Запустите программное обеспечение. Для проведения ПЦР создайте и запустите новый файл.

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

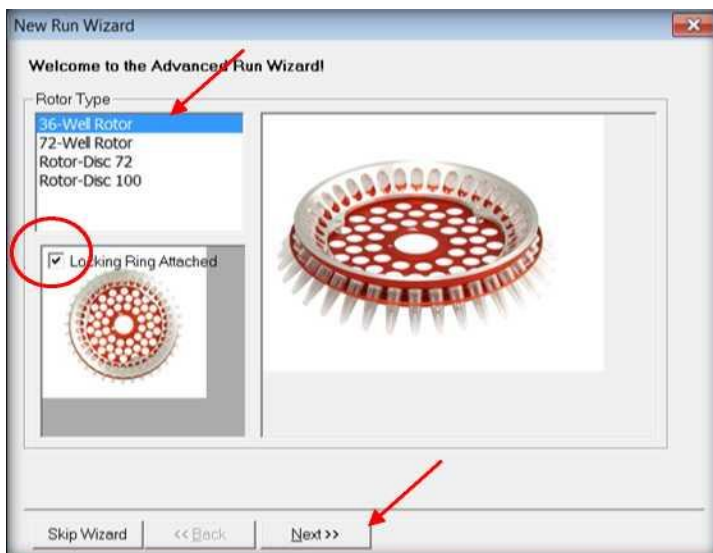
Откройте программу амплификации, нажмите кнопку «New» в основном меню программы.



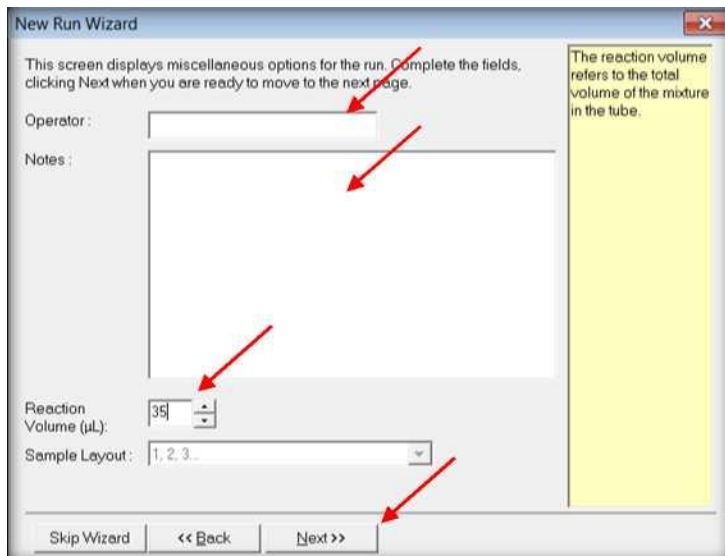
В появившемся окне выберите шаблон запуска «Advanced». Выделите «Empty Run», нажмите кнопку «New».



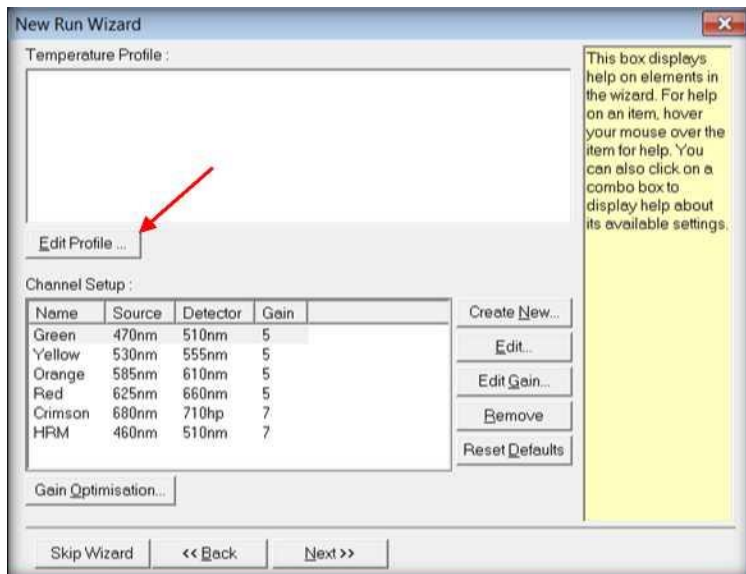
В открывшемся окне выберите 36-луночную карусель. Проверьте, чтобы прижимное кольцо было закреплено правильно, в противном случае его срыв может повредить прибор. Нажмите кнопку «Next».



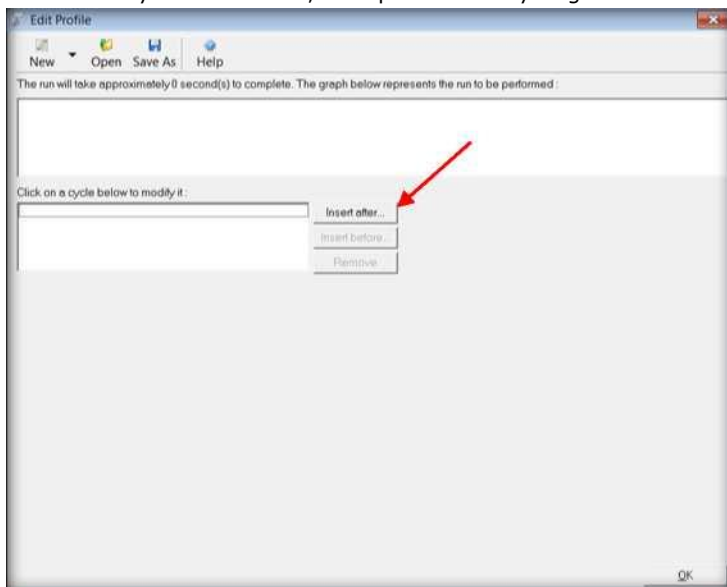
В открывшемся окне задайте имя оператора, описание эксперимента и объём реакционной смеси (35 мкл). Нажмите кнопку «Next».



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
Бурая 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>)	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
Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур (<i>Acidovorax citrulli</i>)	255/FAM/Green	4
Фитоплазма золотистого пожелтения винограда (<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma Vitis</i>)	330/FAM/Green	5
Фитоплазма пролиферации яблони (<i>Apple proliferation phytoplasma</i>)	260/FAM/Green	5
Фитоплазма истощения груши – (<i>Pear decline phytoplasma</i>)	260/FAM/Green	5
Возбудитель бактериального ожога риса (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)	259/FAM/Green	2
Возбудитель сосудистого бактериоза капусты (<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>campestris</i>)	270/FAM/Green	2
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	1
94°C 60°C 64°C*	15 с 5 с 45 с*	50
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	1
94°C 60°C 67°C*	15 с 5 с 45 с	50
10°C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 4. Формат «Real Time»
Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

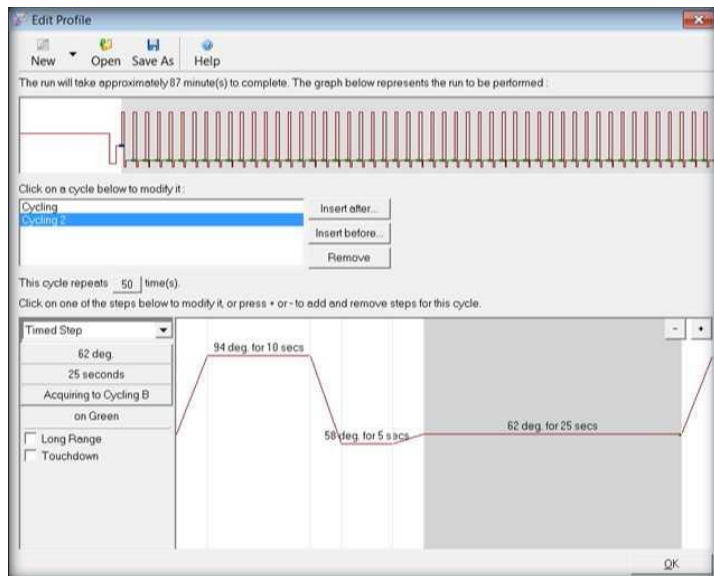
Температура	Время	Количество циклов
94°C	5 мин	1
94°C 60°C* 72°C	30 с 30 с 20 с	50
10°C	Хранение	

*- регистрация результатов

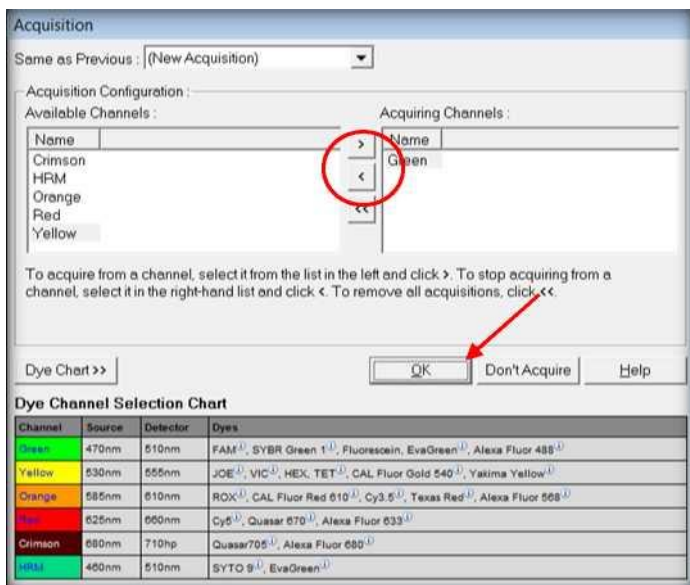
Таблица 5 Формат «Real Time»
Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

Температура	Время	Количество циклов
94°C	5 мин	1
94°C 55°C* 72°C	30 с 30 с 20 с	50
10°C	Хранение	

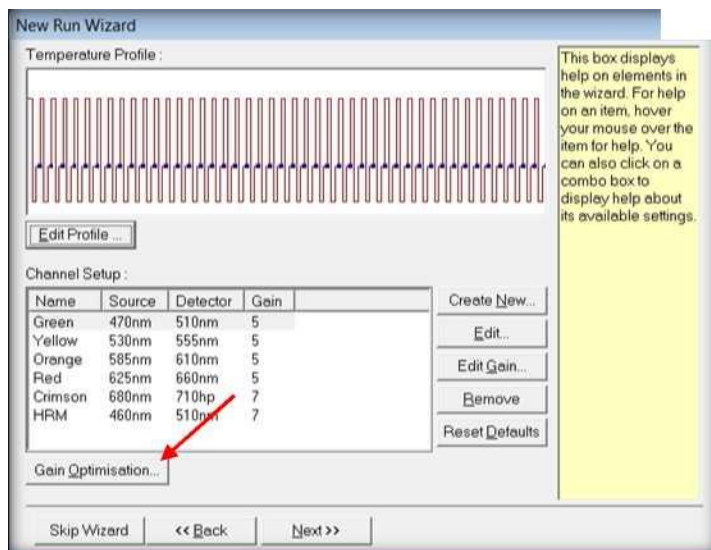
*- регистрация результатов



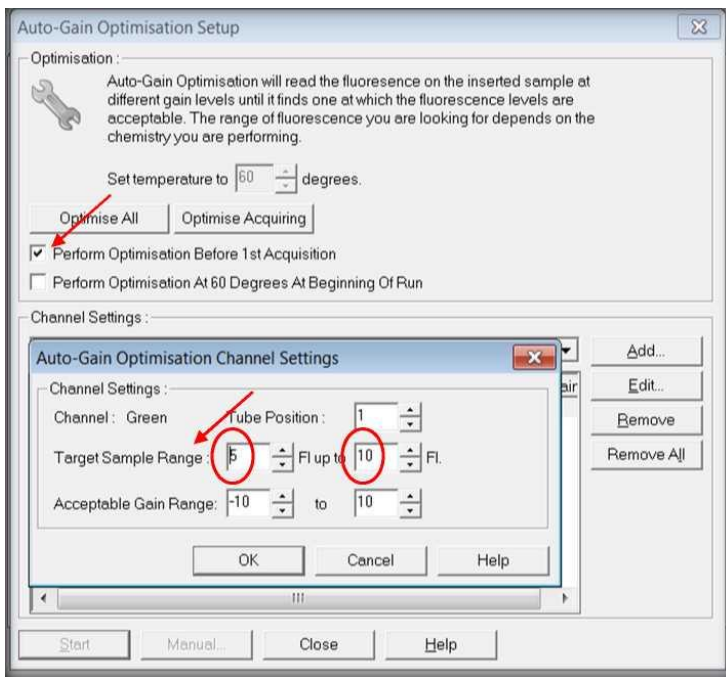
Для добавления канала детекции в соответствующем шаге нажмите кнопку «Not Acquiring» и стрелками переместите название нужных каналов «Green» и «Yellow» в правое окно. После выбора температурного профиля эксперимента нажмите кнопку «OK».



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

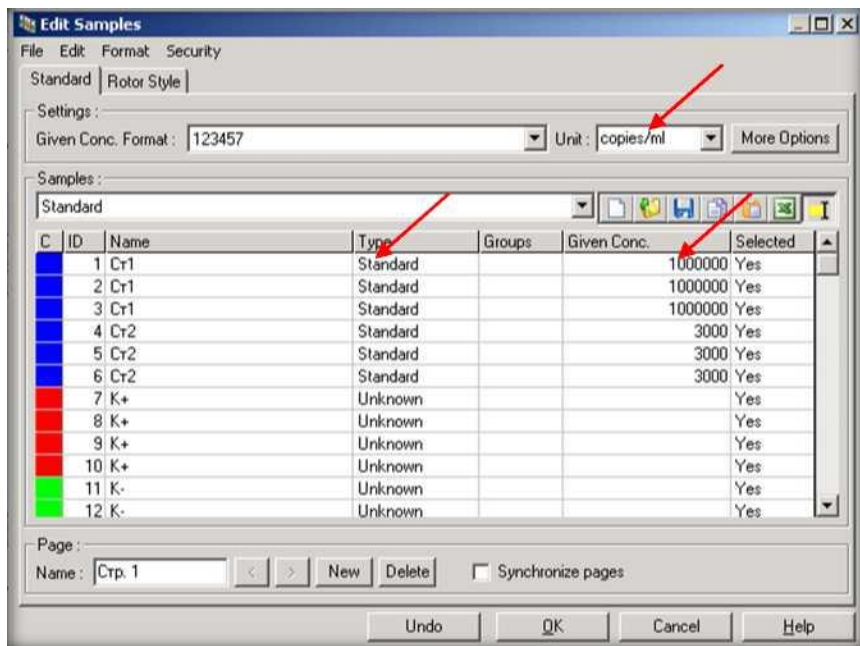


В пункте меню «Channel Settings» выберите каналы «Green» и «Yellow». Установите «Tube Position» 1, «Target Sample Rang» 5 FI up to 10 FI. Установите галочку «Perform Calibration Before 1st Acquisition», нажмите «Close».



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.

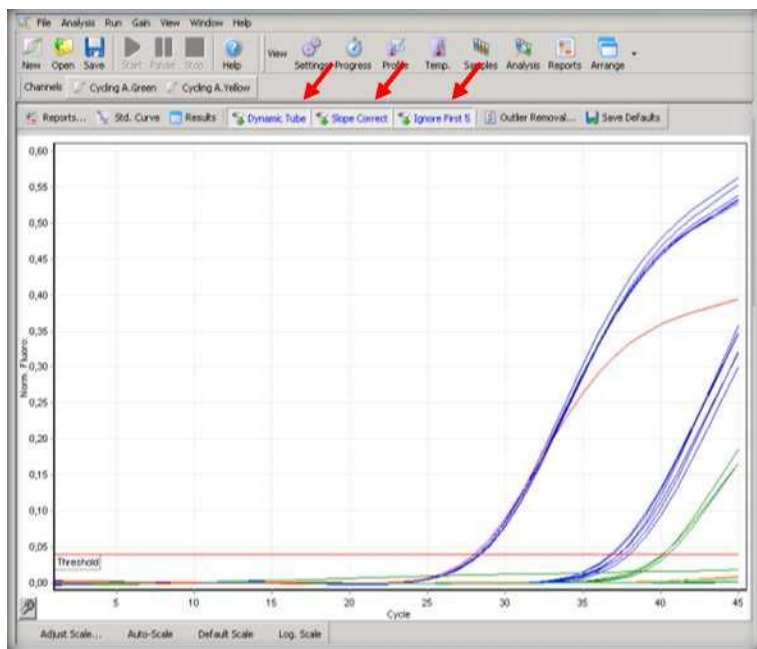
Для проведения анализа необходимо:



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

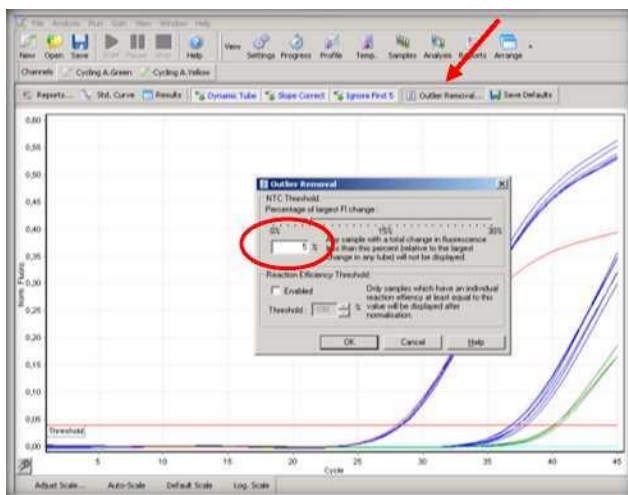


В меню основного окна нажать кнопки «Dynamic tube», «Slope Correct», «Linear Scale».

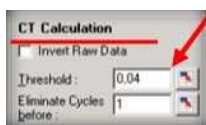


В меню «Ignore First» установить «5».

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.

III. Интерпретация результатов

Учет результатов реакции с помощью детектирующего амплификатора.

- Для биологических образцов, содержащих ДНК фитопатогена, программа фиксирует* значение порогового цикла (Ct) в канале FAM

- (Green). Результат амплификации внутреннего контроля (канал HEX или Yellow) в этом случае в учет не принимается.
- Для биологических образцов, не содержащих ДНК фитопатогена программа не фиксирует значения Ct в канале FAM/Green). При этом программа фиксирует значение Ct для внутреннего контроля (канал HEX/Yellow).
 - В случае отсутствия значений Ct как для канала FAM (Green), так и для канала HEX (Yellow), результат интерпретируется как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.
 - При получении значения Ct для отрицательного контрольного образца (OK), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.
- * - значение порогового цикла должно быть меньше числа циклов амплификации (50).