



Краткая инструкция к комплектам реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК фитопатогенных вирусов (форматы «Real-Time», Corbett Life Science - Rotor-Gene 6000)

Состав (на 50 определений)

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

| Реактив | Количество | |
|--|------------|------------|
| Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ (ОТ-PPV+дНТФ)* | 100 мкл | 1 пробирка |
| | 25 мл | 1 пробирка |
| Обратная транскриптаза | 50 мкл | 1 пробирка |
| ОТ-Буфер | | |

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации

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

* - в комплекте реагентов на возбудителя шарки сливы.

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 «НК-Агро».

1. 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-»).
2. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Таq-полимеразы.
3. Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.
4. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК (кроме пробирок «К-», «К+»). В пробирки, маркированные «К-», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку и реакцию обратной транскрипции, 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.

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 «Real-time»: на приборе Corbett Rotor-Gene 6000 в соответствии с инструкцией к прибору.

Таблица 1. Длины продуктов ПЦР-амплификации и программа амплификации

| Продукт ПЦР-амплификации | Длина продукта амплификации, пн | Программа амплификации |
|---|---------------------------------|------------------------|
| Вирус шарки сливы Plum pox potyvirus | 268/FAM(Green) | 2 |
| Ризомания сахарной свеклы (Beet necrotic yellow vein virus) | 320/FAM (Green) | 3 |
| Андийский латентный вирус карофеля | 300/FAM (Green) | 2 |
| Андийский вирус крапчатости картофеля | 333/FAM (Green) | 2 |
| Вироид веретеновидности клубней картофеля | 260/FAM (Green) | 2 |
| Вироид латентной мозаики персика | 274/FAM (Green) | 3 |
| Вирус жёлтой курчавости листьев томата * | 229/FAM (Green) | 4 |
| Вирус некротической пятнистости бальзамина | 251/FAM (Green) | 3 |
| Вирус бронзовости томата | 239/FAM (Green) | 3 |
| Вирус чёрной кольцевой пятнистости картофеля | 366/FAM (Green) | 3 |
| Вирус кольцевой пятнистости табака | 372/FAM (Green) | 3 |
| Вирус кольцевой пятнистости томата | 325/FAM (Green) | 3 |
| Вирус кольцевой пятнистости малины | 332/FAM (Green) | 3 |
| Т вирус картофеля | 172/FAM (Green) | 4 |
| Вирус пожелтения картофеля | 200/FAM (Green) | 4 |
| Вирус некроза стеблей хризантем | 312/FAM (Green) | 3 |
| Вироид задержки роста хризантем | 234/FAM (Green) | 3 |
| Вирус штриховатой мозаики ячменя | 198/FAM (Green) | 3 |
| Вирус полосатой мозаики пшеницы | 217/FAM (Green) | 3 |
| Вирус мозаики костра | 262/FAM (Green) | 3 |
| Вирус мозаичной карликовости кукурузы | 407/FAM (Green) | 3 |
| Вирус розеточной мозаики персика | 174/FAM (Green) | 2 |
| Вирус коричневой морщинистости плодов томата | 112/FAM (Green) | 2 |
| Внутренний контроль | 560/HEX(Yellow) | |

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.

Срок годности комплектов – 9 месяцев.

Таблица 2. Формат «Real Time»

Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

| Температура | Время | Количество циклов |
|-------------|-------|-------------------|
| 94°C | 2 мин | 1 |
| 94°C | 15 с | 50 |
| 60°C | 5 с | |
| 64°C* | 45 с | |
| | | |

* - установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (FAM) и Yellow (HEX) при 64 °С.

Таблица 3. Формат «Real Time»

Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

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

* - установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (FAM) и Yellow (HEX) при 55 °С.

Таблица 4. Формат «Real Time»

Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

| Температура | Время | Количество циклов |
|-------------|--------|-------------------|
| 94°C | 2 мин | 1 |
| 94°C | 15 сек | 50 |
| 60°C | 30 сек | |
| 67°C* | 30 сек | |
| | | |

* - установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (FAM) и Yellow (HEX) при 67 °С.

Для проведения ПЦР используют амплификатор Rotor-Gene (Corbett Research).

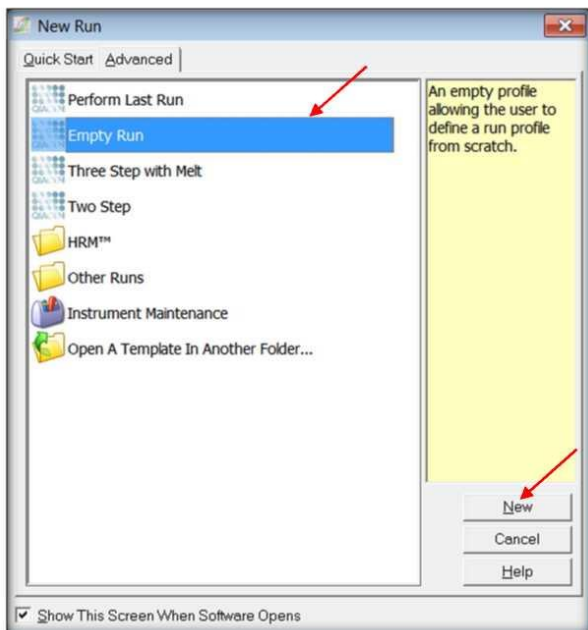
Установите все пробирки в карусель амплификатора, наденьте прижимное кольцо. Проверьте, чтобы карусель была сбалансирована при работе прибора. Номера мест для пробирок в карусели будут соответствовать номерам образцов в программе амплификатора.

Запустите программное обеспечение. Для проведения ПЦР создайте и запустите новый файл (п.8).

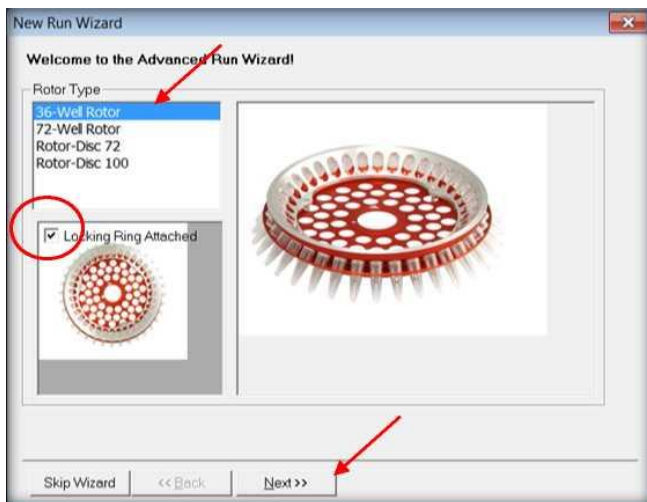
Создание нового файла в программе амплификации необходимо производить в следующем порядке: Откройте программу амплификации, нажмите кнопку «New» в основном меню программы.



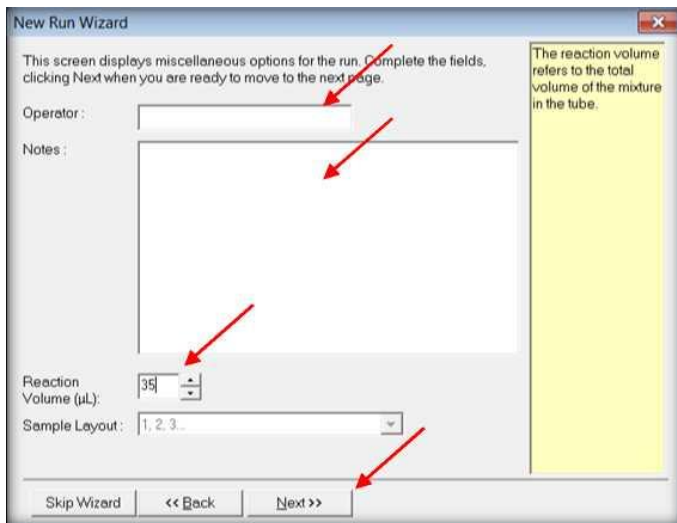
В появившемся окне выберите шаблон запуска «Advanced». Выделите «Empty Run», нажмите кнопку «New».



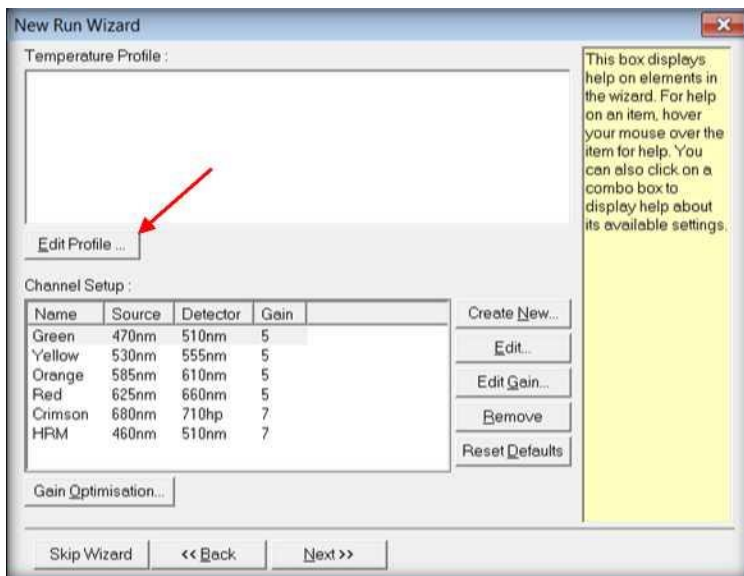
В открывшемся окне выберите 36-луночную карусель. Проверьте, чтобы прижимное кольцо было закреплено правильно, в противном случае его срыв может повредить прибор. Нажмите кнопку «Next».



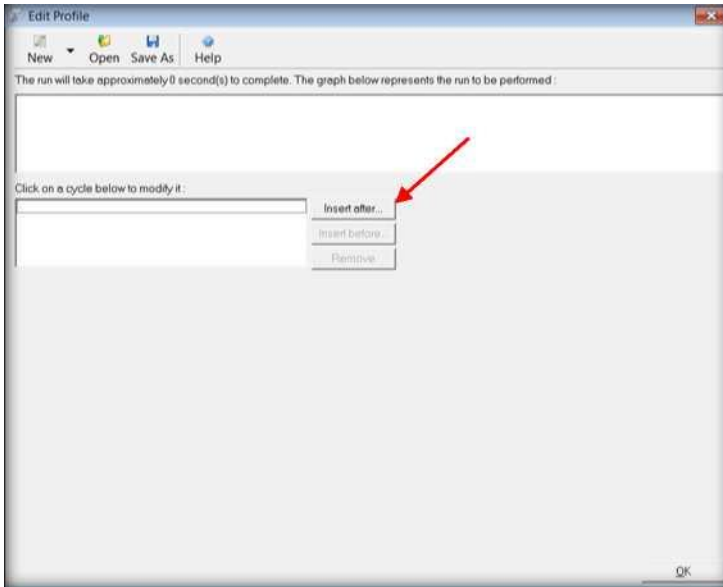
В открывшемся окне задайте имя оператора, описание эксперимента и объём реакционной смеси (35 мкл). Нажмите кнопку «Next».



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

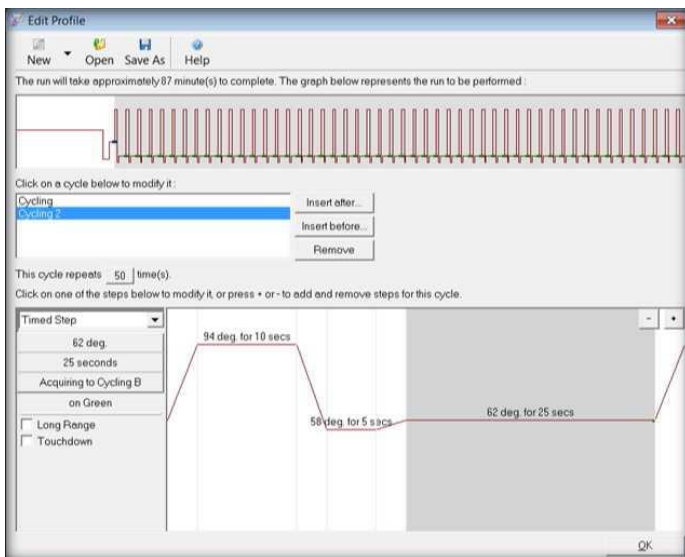


Нажмите кнопку «Insert after», выберите «New Cycling».

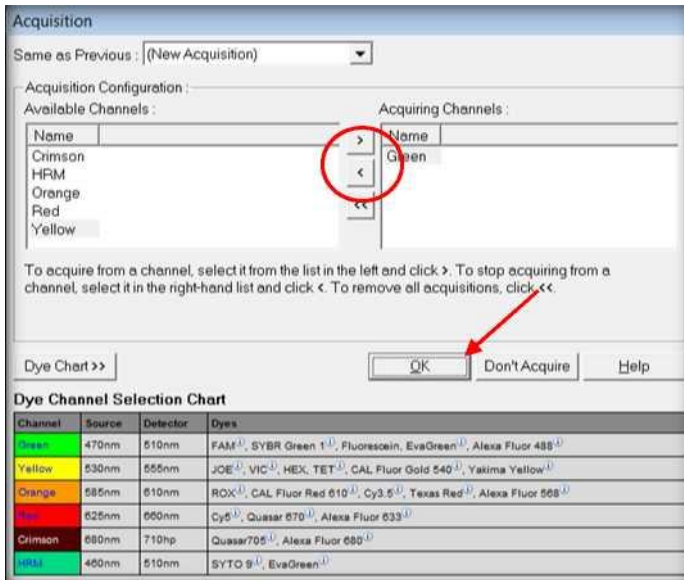


Создайте температурный профиль эксперимента (таблица 2).

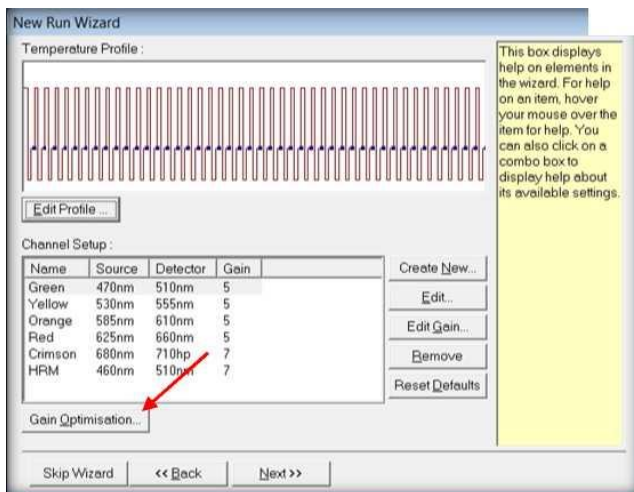
Для этого с помощью «This cycle repeats» задайте количество циклов в соответствующем циклировании. Кнопками «+» или «-» можно добавлять или удалять температурные полки. Для редакции параметров температурных полок выделите мышкой соответствующий шаг и используйте кнопки «deg.» (градусы), «seconds» (время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



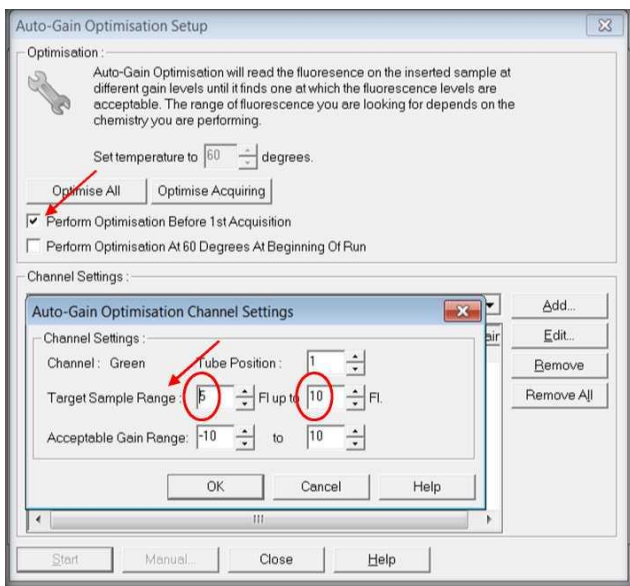
Для добавления канала детекции в соответствующем шаге нажмите кнопку «Not Acquiring» и стрелками переместите название нужных каналов «Green» и «Yellow» в правое окно. После выбора температурного профиля эксперимента нажмите кнопку «OK».



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

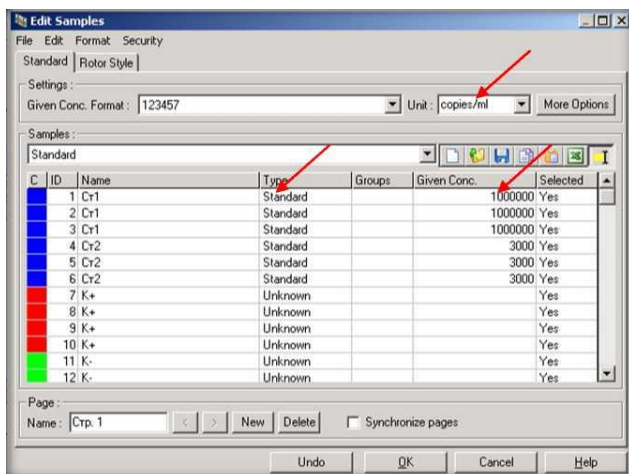


В пункте меню «Channel Settings» выберите каналы «Green» и «Yellow». Установите «Tube Position» 1, «Target Sample Rang» 5 FI up to 10 FI. Установите галочку «Perform Calibration Before 1st Acquisition», нажмите «Close».



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.

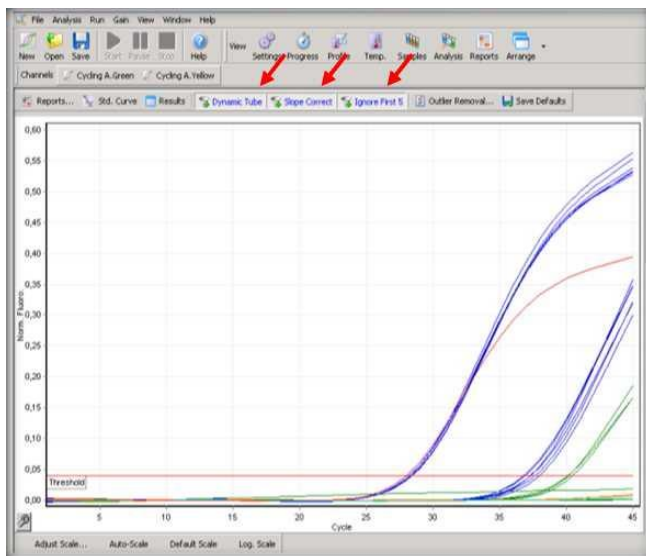


Для проведения анализа необходимо:

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

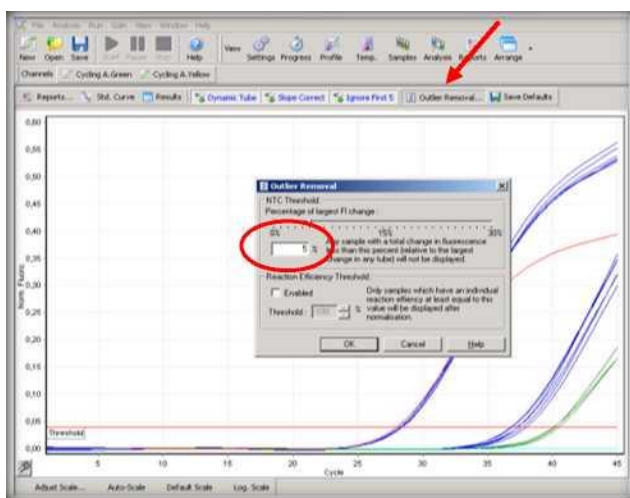


В меню основного окна нажать кнопки «Dynamic tube», «Slope Correct», «Linear Scale».

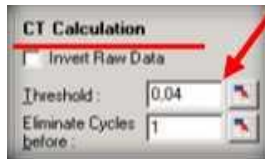


В меню «Ignore First» установить «5».

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.

V. 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).