

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

Редакция № 4 от 14.04.2022

Состав (на 50 определений)

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

* - для формата «Real-Time» пробирки могут быть заменены 6 стрипами по 8 пробирок. В этом случае общее число определений составляет 48.

** - в комплекте реагентов для FLASH.

**Инструкция по применению
I. Постановка амплификации**

- Промаркируйте пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (с учетом пробирок для положительного контрольного образца - «К+» и для отрицательного контрольного образца - «К-»).
- Примечание. Пробирки для формата «Real-Time» нельзя подписывать на крышечке.
- При использовании для учета результатов амплификации ПЦР-детектора (формат «Flash») промаркируйте дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фоновой флуоресценции.
- 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.
- Добавьте в каждую пробирку по 20 мкл минерального масла, плотно закройте пробирки.
- Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.
- Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»). В пробирки, маркированные «К-» и «ФОН», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку в пробирку, маркированную «К+», внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
- Установите все пробирки в амплификатор и проведите ПЦР в режиме, приведенном в таблице 1-11, с учетом объема реакционной смеси 35 мкл и модели амплификатора.

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 «Flash»: с помощью ПЦР-детектора «Джин» согласно инструкции к прибору или с помощью гель-электрофореза (см. табл.2-3 и инструкцию для проведения гель-электрофореза). Пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10; и для внутреннего контроля- 2,50).
- Формат «Real-time»: на приборах ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт («ДНК-Технология») или других (табл. 1) в соответствии с инструкциями к приборам.

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

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пн/ канал детекции	Программа амплификации			
		FLASH/ форез	ДТ-96/ ДТ-322/ ДТпрайм/ ДТлайт	CFX96	ABI 7500
<i>Сосновые древесные нематоды (Bursaphelenchus xylophilus, B. mucronatus)**</i>	280/FAM	2	4	12	6
<i>Бактериальный рак томатов (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis)</i>	180/FAM	2	4	12	6
<i>Кольцевая гниль картофеля (Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus)</i>	136/FAM	3	5	13	7
<i>Бактериальный ожог плодовых (Erwinia amylovora)</i>	257/FAM	2	4	12	6
<i>Водянистая гниль плодов (Erwinia carotovora subsp. carotovora)</i>	314/FAM	2	4	12	6
<i>Бледная картофельная цистообразующая нематода (Globodera pallida)</i>	136/FAM	3	5	13	7
<i>Золотистая картофельная цистообразующая нематода (Globodera rostochiensis)</i>	304/FAM	3	5	13	7
<i>Аскохитоз (грибы Ascochyta/Didymella/Phoma)</i>	230/FAM	2	4	12	6
<i>Некроз сердцевин стебля томата (Pseudomonas corrugata)</i>	240/FAM	2	4	12	6
<i>Бурная бактериальная гниль (Ralstonia solanacearum)</i>	256/FAM	2	4	12	6
<i>Черная бактериальная пятнистость томатов (Xanthomonas campestris Xanthomonas euvesicatoria, сун. Xanthomonas campestris pv. vesicatoria)</i>	294/FAM	2	4	12	6
<i>Бактериальный вилт кукурузы (Pantoea stewartii)</i>	215/FAM	2	4	12	6
<i>Септориоз злаков (Septoria tritici, Stangospora (Septoria) nodorum)**</i>	250/FAM	2	4	12	6
<i>Угловатая пятнистость листьев (Pseudomonas syringae pv. lacrymans)</i>	162/FAM	2	5	13	6
<i>Фузариоз злаков - Fusarium graminearum</i>	335/FAM	2	4	12	6
<i>Фузариоз злаков - Fusarium culmorum</i>	333/FAM	2	4	12	6
<i>Фузариоз злаков - Fusarium sporotrichioides</i>	310/FAM	2	4	12	6
<i>Фузариоз злаков - Fusarium langsethiae</i>	306/FAM	2	4	12	6
<i>Фузариоз злаков - Fusarium poae</i>	299/FAM	2	4	12	6
<i>Фузариоз злаков - Fusarium avenaceum</i>	236/FAM	2	4	12	6
<i>Фузариоз злаков - Fusarium tricinatum</i>	235/FAM	2	4	12	6
<i>F. graminearum, F. culmorum</i> — токсины DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, FUSX, ZEA	410/FAM	2	4	12	6
<i>F. sporotrichioides, F. langsethiae</i> — токсины T-2, HT-2, DAS, NEO, ZEA	333/FAM	2	4	12	6
<i>F. poae</i> — токсины NIV, FUSX, T-2, HT-2, DAS, ZEA	188/FAM	2	4	12	6
<i>F. avenaceum, F. tricinatum</i> — токсины MON, BEA, ENN	289/FAM	2	4	12	6

Фузариоз злаков - <i>Fusarium cerealis</i>	300/FAM	10	16	14	8
Плодовая средиземноморская муха – <i>Ceratitidis capitata</i>	300/FAM	10	16	14	8
Фомопсис подсолнечника – <i>Diaporthe helianthi (Phomopsis helianthi)</i>	331/FAM	2	4	12	6
Гниль сахарной свёклы – <i>Pseudomonas syringae</i>	170/FAM	2	4	12	6
Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур – <i>Acidovorax citrulli</i>	255/FAM	-	16	14	9
Фитоплазма золотистого пожелтения винограда - <i>Candidatus Phytoplasma Vitis</i>	330/FAM	-	15	11	8
Фитоплазма пролиферации яблони – <i>Apple proliferation phytoplasma</i>	260/FAM	-	15	11	8
Фитоплазма истощения груши – <i>Pear decline phytoplasma</i>	260/FAM	-	15	11	8
Возбудитель бактериального ожога риса (<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>)	259/FAM	-	16	14	9
Возбудитель сосудистого бактериоза калусты (<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>)	270/FAM	-	16	14	9
Внутренний контроль (тест-системы на FLASH/форез)	560/HEX	-	-	-	-

Внимание! При использовании других амплификаторов свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации
*- регистрация результатов

Таблица 2. Режим амплификации для амплификатора «Терцик» алгоритм регулирования: «точный»

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин 30 с	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. Режим амплификации для амплификатора «Терцик» алгоритм регулирования: «точный»

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин 30 с	1
94°C	5 с	5
67°C	15 с	
94°C	1 с	40
67°C	15 с	
10°C	хранение	

Таблица 4. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт

Температура	Время	Количество циклов
80°C	30 с	1
94°C	1 мин 30 с	5
94°C	30 с	
64°C*	30 с	
94°C	10 с	45
64°C*	30 с	
10°C	Хранение	

Таблица 5. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт

Температура	Время	Количество циклов
80°C	30 с	1
94°C	1 мин 30 с	5
94°C	30 с	
67°C*	30 с	
94°C	10 с	45
67°C*	30 с	
10°C	Хранение	

Таблица 6. 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
64°C*	30 с	
60°C*	1 мин	1
10°C	хранение	

Таблица 7. 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
67°C*	30 с	
60°C*	1 мин	1
10°C	хранение	

Таблица 8. 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
10°C	хранение	

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
60°C*	15 с	
72°C*	20 с	
60°C*	1 мин	1
10°C	хранение	

Таблица 10. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт/BioRad CFX96
Формат «Форез» для амплификатора Терцик.

Температура	Время	Количество циклов
94 °С	1 мин	1
94 °С	10 с	50
60 °С *	15 с	
67 °С	20 с	
10 °С	хранение	

Таблица 11. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт/BioRad CFX96
Формат «Форез» для амплификатора Терцик.

Температура	Время	Количество циклов
94 °С	2 мин	1
94 °С	10 с	45
55°C *	30 с	
72 °С	10 с	
10 °С	хранение	

Таблица 12. 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 13. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора BioRad CFX96

Температура	Время	Количество циклов
94°C	3 мин	1
94°C	15 с	45
67°C*	45 с	

*- регистрация результатов

Таблица 14. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора BioRad CFX96

Температура	Время	Количество циклов
94°C	3 мин	1
94°C	15 с	45
60°C*	45 с	

*- регистрация результатов

Таблица 15. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт/BioRad CFX96
Формат «Форез» для амплификатора Терцик.

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

Таблица 16. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/ДТпрайм/ДТлайт/BioRad CFX96
Формат «Форез» для амплификатора Терцик.

Температура	Время	Количество циклов
94 °С	1 мин	1
94 °С	10 с	45
60 °С *	15 с	
67 °С	10 с	
10 °С	хранение	

- Примечание: инструкции по использованию наборов при работе с прибором RotorGene-6000 доступны в электронном формате по адресу: <https://agrodiagnostica.ru/docsandinstructions/instructions/>