

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ФИТОПАТОЛОГИИ

**Диагностика основных фитопатогенов огурца и томата
при выращивании в закрытом грунте методом полимеразной цепной
реакции в формате FLASH с использованием диагностических
наборов производства ООО «АгроДиагностика»**

(Методические указания)

Москва 2008

Методические рекомендации подготовлены на основе исследований, проведенных научными коллективами ИБХ РАН, ВНИИФ РАСХН и ООО «АгроДиагностика» в составе: Д.Ю. Рязанцев, к.б.н. Д.В. Ребриков, П.Е. Дробязина, проф., чл.-корр. РАСХН С.К. Завриев.

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены Ученым Советом ВНИИ фитопатологии РАСХН 28 мая 2008, протокол № 14

Рецензент – д.б.н. А.Н. Игнатов

Методические рекомендации предназначены для специалистов-фитопатологов и агрономов, занимающихся выращиванием овощей в условиях закрытого грунта.

Введение

Площадь тепличных хозяйств в Российской Федерации составляет чуть более 2 тыс. га, причем производство овощей закрытого грунта постоянно возрастает (по данным Аналитического центра при Правительстве РФ, <http://www.csa.gov.ru/>). Специфические условия сельскохозяйственного производства в защищенном грунте – высокая температура и влажность воздуха и грунта, длительный вегетационный период, многократное использования одного и того же грунта, высокая скорость распространения инфекции – активно способствуют накоплению и развитию патогенных микроорганизмов. Поэтому в процессе этого производства возникает необходимость диагностики фитопатогенного состояния растений, посевного материала и почв закрытого грунта. Несмотря на это, в стране практически полностью (за исключением анализа на наличие карантинных патогенов), отсутствует система предварительной диагностики инфекций в закупаемом посевном материале, следствием этого является резкое повышение затрат на химические средства защиты растений и существенные количественные и качественные потери урожая. Компания ООО «АгроДиагностика» разработала диагностические наборы для ПЦР-диагностики ряда наиболее патогенных микроорганизмов защищенного грунта, особенно важных при выращивании овощных культур, в первую очередь огурцов и томатов. Применение таких диагностических наборов позволяет получить в течение нескольких часов быстрые и достоверные (со специфичностью анализа более 95%) результаты, позволяющие сделать своевременную выбраковку семенного материала, а также при необходимости подобрать оптимальные состав и дозы реагентов для химической обработки растений, уменьшая тем самым потери урожая.

1. Общие положения и область применения

1.1 Настоящие методические указания содержат описание методов качественного определения следующих фитопатогенов томата и огурца:

- Бактериальный рак томатов (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)
- Некроз сердцевины стебля томата (*Pseudomonas corrugata*)
- Черная бактериальная пятнистость томатов (*Xanthomonas euvesicatoria* (ранее *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* тип А)
- Водянистая гниль плодов (*Pectobacterium* (syn. *Erwinia*) *carotovorum* subsp. *carotovorum*)
- Угловатая пятнистость листьев (*Pseudomonas syringae* pv. *Lacrimans*, ранее *Pseudomonas lacrimans*)
- Водянистая гниль плодов (*Pseudomonas carotovorum* subsp. *carotovorum*)
- Аскохитоз огурца (*Ascochyta cucumis*; *Phoma cucurbitacearum*; *Didymella bryoniae*)
- Аскохитоз томата (*Ascochyta lycopersici* (син. *Didymella lycopersici*);

Также возможна диагностика других грибов рода *Ascochyta* (*Didymella*, *Phoma*).

1.2 Диагностика осуществляется с использованием наборов производства ООО «АгроДиагностика» методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием флуоресцентной детекции продуктов амплификации непосредственно после проведения ПЦР методом FLASH (Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization).

1.3 Методические рекомендации предназначены для лабораторного применения наборов для нужд хозяйств, занимающихся выращиванием томата и огурца в условиях защищенного грунта.

1.4 Методические рекомендации могут применяться для контроля качества семенного материала, закупаемого для выращивания в условиях

защищенного грунта; осуществления своевременной диагностики выше перечисленных заболеваний в процессе выращивания томата и огурца; а также при контроле за возможным наличием перечисленных фитопатогенов в тепличном грунте.

2. Нормативные ссылки

2.1 Методические указания МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности» - Минздрав России, 2004.

2.2 ГОСТ 12036-85 Семена сельскохозяйственных культур. Правила приемки и методы отбора проб

2.3 ГОСТ 28676.8-90 Семена овощных, бахчевых культур, кормовых корнеплодов и кормовой капусты. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.

2.4 ГОСТ 28168-89 Почвы. Отбор проб

2.5 ГОСТ 28676.7-90 Семена тепличных сортов и гибридов огурца и томата. Сортные и посевные качества. Технические условия.

2.6 ГОСТ 12430-66 Продукция сельскохозяйственная. Методы отбора проб при карантинном досмотре и экспертизе.

3. Принцип метода

Метод выявления фитопатогенов в семенах, растительном материале и образцах почвы с помощью диагностических наборов ООО «АгроДиагностика» основан на использовании ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в формате FLASH непосредственно после завершения реакции амплификации.

3.1 Этапы определения фитопатогенов

Качественное определение присутствия выше описанных фитопатогенов огурца и томата с помощью диагностических наборов ООО «АгроДиагностика» состоит из следующих этапов (Рисунок 1):

3.1.1 Отбор проб анализируемого образца.

3.1.2 Выделение тотальной ДНК из исследуемого образца с помощью реагентов «ПРОБА-ГС» (для образцов семян и почв) или «ПРОБА-ЦТАБ» (для образцов растительного материала) производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология» (<http://www.dna-technology.ru/>).

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

3.1.4 Детекция результатов амплификации с помощью ПЦР-детектора «ДЖИН» (производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология») в формате FLASH.

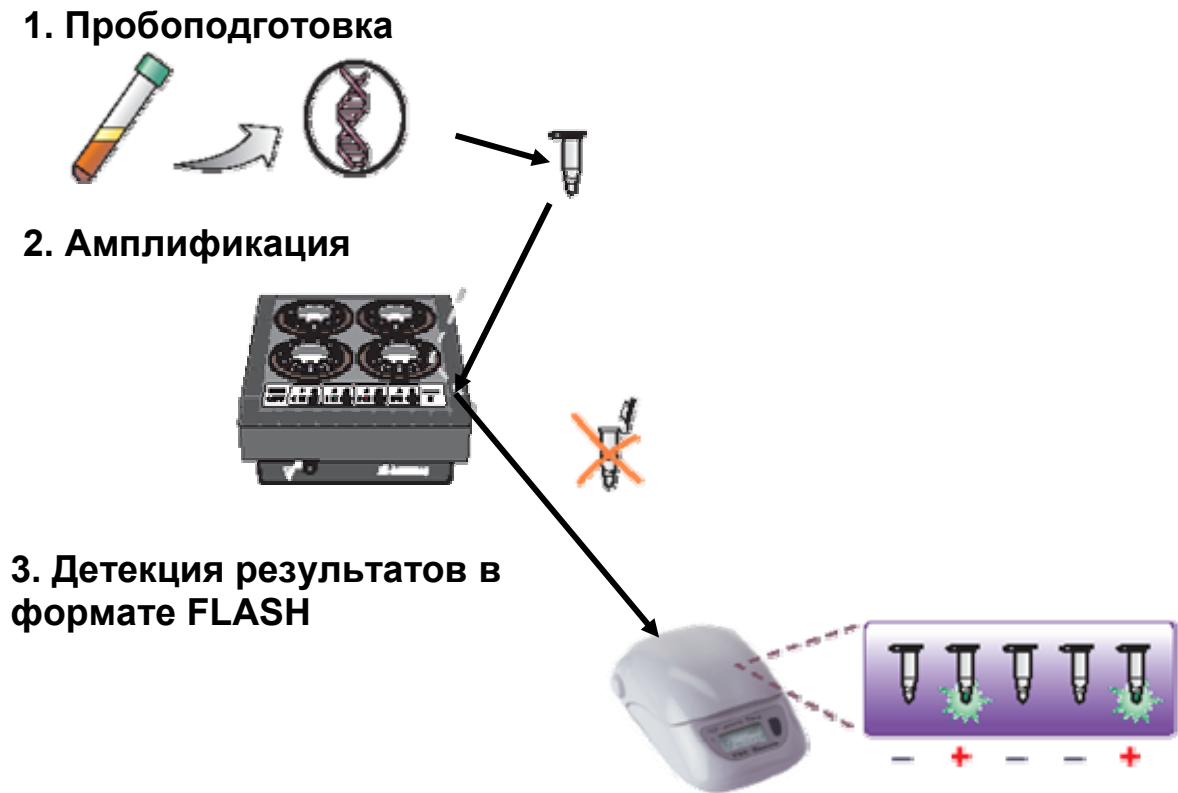


Рисунок 1. Этапы определения фитопатогенов с помощью диагностических наборов ООО «АгроДиагностика».

4. Требования к помещениям и техника безопасности

4.1 Общие требования

Общее расположение лаборатории, а также ее 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 работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

4.2.6 Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания, так как высокое напряжение опасно для жизни.

4.2.7 На стадиях диагностики следует использовать только новые наконечники и пробирки, не допускается использование одних и тех же

наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.2.8 Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с включенным ламинарным током воздуха.

4.2.9 Для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими необходимыми материалами.

4.2.10 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

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

4.2.12 Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно до и после окончания работ облучать бактерицидными облучателями.

5. Оборудование, материалы и реактивы

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

5.1 Оборудование и материалы:

- ДНК амплификатор;
- ПЦР-детектор «ДЖИН» (производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология»);

- центрифуга с ротором для пробирок объемом 1,5 мл со скоростью вращения до 13000 об/мин;
- центрифуга с ротором для пробирок объемом 15 мл со скоростью вращения до 5000 об/мин;
- термостат твердотельный с прижимной крышкой, поддерживающий температуру 70°C (например, «ГНОМ» производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология»);
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объемом 15 мл (например, BD Falcon™ Conical Tubes
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки резиновые;
- пестики-гомогенизаторы для пробирок пластиковых объемом 1,5 мл;
- штативы для микропробирок на 0,2; 0,6; 1,5; 15 и 50 мл;
- холодильник с отделениями на 2...8°C и на -18...-20 °C (ГОСТ 26678);
- 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);

- ступки фарфоровые с пестиком.

5.2 Реактивы.

5.2.1 Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала «ПРОБА-ГС» (производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология»), включающий (на 50 выделений):

- лизирующий раствор, 15 мл, 1 флакон;
- сорбент, 2 мл, 1 флакон;
- промывочный раствор №1, 20 мл, 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 20 мл, 1 флакон;
- промывочный раствор №3, 20 мл, 1 флакон;
- элюирующий раствор, 10 мл, 1 флакон.

5.2.2 Комплекты реагентов для выделения ДНК из ратительного материала «ПРОБА-ЦТАБ» (производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология»), включающий (на 50 выделений):

- Смесь №1, 23 мг, 5 пробирок
- Раствор №2, 12,5 мл, 1 флакон
- Раствор №3, 12,5 мл, 1 флакон
- Раствор №4, 5 мл, 1 флакон
- Раствор №5, 25 мл, 1 флакон
- Раствор №6, 38 мл, 1 флакон
- Раствор №7, 50 мл, 1 флакон
- Раствор №8, 50 мл, 1 флакон

5.2.3 Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК, включающий (на 50 образцов):

- амплификационная смесь, запечатанная парафином, 50 пробирок по 20 мкл;
- минеральное масло;
- раствор Таq-полимеразы, 500 мкл, 1 пробирка;

- буферный раствор «ПЦР-буфер», 200 мкл, 1 пробирка;
- положительный контрольный образец кДНК, 150 мкл, 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, флуоресцентно меченые ДНК-зонды, праймеры, внутренний контрольный образец.

6. Отбор, хранение и подготовка образцов для анализа

Отбор проб проводят в соответствии с методическими документами, устанавливающими порядок отбора проб семян, растительного материала и почв.

6.1 Отбор образцов для анализа.

6.1.1 Семена овощных культур отбирают по ГОСТу 12036-85 в несколько этапов: отбор точечных проб, составление объединенной пробы и выделение средней пробы. Для семян овощных культур, упакованных в пакеты, точечной пробой является пакеты, отобранные в соответствии с требованиями ГОСТа 12036-85.

Таблица 1.

Количество выделенных для отбора проб мешков или пакетов семян овощных культур при массе упаковочной единицы до 10 кг включительно

Масса семян в пакете (мешке), кг	Количество пакетов в партии (не более), шт	Количество пакетов, выделенных для отбора проб, %
до 0.1 включительно	1000	2.0
0.1-0.5	1000	1.5
0.6-1.0	1000	1.5
1.1-3.0	500	1.0
3.1-10.0	200	10.0

Из отобранных в соответствии с таблицей 1 пакетов составляют точечную пробу семян (при этом размер точечной пробы должен

составлять не менее 400 семян с каждого кг исходной партии согласно ISTA Handbook on Seed Health Testing). Точечные пробы, отобранные от партии семян, соединяют в объединенную пробу. Из объединенной пробы выбирают среднюю пробу методом квартования: объединенную пробу раскладывают ровным слоем толщиной 1,5 – 2,0 см так, чтобы получился квадрат, который затем делят диагоналями на четыре треугольника, содержимое двух противоположных треугольников выбрасывают, а двух других объединяют. Необходимо продолжать квартование до размера средней пробы 100 семян.

6.1.2 Отбор проб образцов растительного материала проводят в следующем порядке: отбор проб с площади теплицы; составление объединенной пробы; выделение средней (лабораторной) пробы. Пробы растений защищенного грунта отбирают методом "конверта", то есть путем отбора точечных проб по углам и в центре обследуемого участка. При больших площадях теплицы используют систему "двойного-тройного конверта". Далее из точечных проб составляют объединенную пробу. Для этого точечные пробы объединяют, измельчают и тщательно перемешивают. Из объединенной пробы отбирают среднюю, которую составляют из точечных проб методом квартования. Общее число анализируемых растений в объединенной пробе с каждого "конверта" должно составлять примерно 20-30 штук, при этом с каждого растения рекомендуется отбирать образец, весом 2 г, таким образом, масса объединенной пробы составит 40-60 г. Масса средней (лабораторной) пробы должна составлять не менее 0,2 г.

6.1.3 Образцы почв с площади теплицы отбирают методом конверта, по диагонали или любым другим способом в соответствии с ГОСТ 28168-89.

6.2 Подготовка образцов анализируемого материала к анализу.

6.2.1 Среднюю пробу семян залить равным объемом экстрагирующего буфера (0.1M NaCl, 10mM Tris Cl с рН 8.0, 25mM 0.5M EDTA, 0.5% SDS), инкубировать 30 мин. при комнатной температуре, периодически помешивая. Затем перелить жидкую фазу в пробирку соответствующего объема (15 мл), добавить равный объем изопропилового спирта, перемешать, инкубировать 30 мин. при -20°C, центрифугировать при 5000 об/мин 30 мин., ресуспендировать осадок в 200 мкл воды, далее проводить выделение ДНК с помощью реагентов «ПРОБА-ГС» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»), используя 50 мкл суспензии.

6.2.2 Для того, чтобы средняя проба растительного материала была представительной, необходимо проводить ее отбор из объединенной пробы следующим образом. Объединенную пробу (40-60 г) с анализируемой площади необходимо измельчить и перемешать, затем отобрать из нее среднюю пробу (0,2 г). Далее проводить выделение ДНК с помощью реагентов «ПРОБА-ЦТАБ» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»).

6.2.3 Почва не требует предварительной подготовки, такой как высушивание, измельчение, просеивание и лизис (Bürgmann H., M. Pesaro, F. Widmer and J. Zeyer. 2001. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. J. Microbiol. Methods. 45:7-20). Из образцов почвы необходимо приготовить суспензию и дать отстояться механическим примесям. Далее использовать 50 мкл надосадочной жидкости для выделения ДНК с помощью набора реагентов «ПРОБА-ГС» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»).

6.3 Хранение и транспортировка проб.

6.3.1 Средние пробы семян до предварительной пробоподготовки рекомендуется хранить и транспортировать в одноразовых влагонепроницаемых пакетах при соблюдении условий хранения, указанных для конкретной партии семян. После проведения

пробоподготовки рекомендуется хранение образцов выделенной ДНК сроком до 3 месяцев при -20°C .

6.3.2 Средние пробы растительного материала как до, так и после предварительной пробоподготовки не рекомендуется хранить длительное время. В случае необходимости возможно хранение образцов при -20°C .

6.3.3 Образцы почвы также не рекомендуется хранить длительное время. При необходимости хранения, необходимо провести высушивание образцов, либо хранить их в замороженном виде при -20°C .

7. Порядок проведения анализа

7.1 Выделение ДНК из образцов семян и почв с помощью «ПРОБА-ГС»

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

Выделение ДНК из биологического материала включает следующую последовательность операций.

ВНИМАНИЕ! Данная инструкция отличается от прилагающейся к набору.

7.1.1 В каждую пробирку с образцом (50 мкл суспензии) добавить по 150 мкл лизирующего раствора, встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 сек, далее термостатировать пробирки в течение 20 мин при 50°C , а затем центрифугировать при 13000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отобрать в чистую пробирку.

7.1.2 В каждую пробирку с надосадочной жидкостью добавить по 20 мкл предварительно ресуспендированного сорбента.

7.1.3 Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуры, помешивая содержимое каждые 2 минуты.

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

7.1.5 Удалить надосадочную жидкость.

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

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

7.1.8 Удалить надосадочную жидкость.

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

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

7.1.11 Удалить надосадочную жидкость.

7.1.12 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.13 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

7.1.14 Удалить надосадочную жидкость.

7.1.15 Открыть крышку пробирки и термостатировать пробирку при 50°C в течении 5 мин.

7.1.16 Добавить к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 5-10 сек.

7.1.17 Термостатировать пробирку при 50°C в течение 5 мин.

7.1.18 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Если образец предполагается хранить, перенести 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; при наличии осадка необходимо перед началом работы проинкубировать флакон при 50°C в течение 15-20 мин для растворения осадка.

7.2 Выделение ДНК из растительного материала с помощью «ПРОБА-ЦТАБ»

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

Выделение ДНК из растительного материала включает следующую последовательность операций.

7.2.1 Приготовить буфер для выделения (на 10 образцов):

- добавить в пробирку со смесью №1 2,5 мл раствора №2,
- гомогенизировать на вортексе до полного растворения содержимого пробирки,
- добавить 2,5 мл раствора №3 и 1 мл раствора №4,
- гомогенизировать пробирку на вортексе в течение 3-5 с.

ВНИМАНИЕ! Готовый буфер для выделения не подлежит хранению, его необходимо использовать в течение 12 часов после приготовления!

7.2.2 В пластиковую пробирку объёмом 1.5 мл, содержащую 20-50 мг анализируемого материала, добавить 500 мкл буфера для выделения, тщательно гомогенизировать образец и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.3 Термостатировать пробирку в течение 5 мин при 65°C.

7.2.4 Добавить 500 мкл раствора №5 и гомогенизировать пробирку на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.5 Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 13000 об/мин.

7.2.6 Аккуратно перенести верхнюю фазу в новую пробирку.

7.2.7 Добавить 750 мкл раствора №6 и перемешать, 2-3 раза аккуратно перевернув пробирку.

7.2.8 Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 13000 об/мин.

7.2.9 Удалить надосадочную жидкость.

7.2.10 Добавить 1 мл раствора №7 и несколько раз перевернуть пробирку (на этой стадии образец можно хранить при температуре -20°C в течение 7 дней).

7.2.11 Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 13000 об/мин.

7.2.12 Удалить надосадочную жидкость.

7.2.13 Подсушить осадок термостатированием пробирки с открытой крышкой в течение 5 мин при 65°C.

7.2.14 Добавить 100 мкл раствора №8.

7.2.15 Термостатировать пробирку в течение 15 мин при 65°C, периодически перемешивая содержимое пробирки.

Полученный препарат ДНК можно хранить при температуре -20°C в течение 6 месяцев.

ВНИМАНИЕ! Для использования в ПЦР препарат ДНК необходимо развести в 10 раз раствором №8

7.3 Подготовка и проведение ПЦР

7.3.1 Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации, с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца («К-») и для положительного контрольного образца («К+»), также дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.

7.3.2 Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.

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

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

7.3.5 Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.3.6 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.

7.3.7 В пробирки, промаркированные «ФОН», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

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

7.3.9 Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл (Таблица 2).

После окончания амплификации пробирки перенести в отдельное помещение для проведения детекции результатов ПЦР с помощью ПЦР-детектора «ДЖИН».

Таблица 2.

Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»), алгоритм регулирования: «точный»

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	93 °С	1 мин 30 с	1
2.	93 °С	20 с	5
	64 °С	5 с	
3.	67 °С	5 с	40
	93 °С	1 с	
	64 °С	5 с	
4.	67 °С	5 с	
	10 °С	хранение	

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, программу амплификации необходимо уточнить у представителя ООО «АгроДиагностика».

Примечание: При работе с наборами готовые нормировочные пробирки («ФОН») допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при 2-8°C в течение 1 месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25°C), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7.4 Регистрация результатов амплификации

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору.

Примечание: пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10; для внутреннего контроля – 2,50.

7.5 Учет результатов реакции с помощью ПЦР-детектора

7.5.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором (Рис. 2).

7.5.2 В биологических образцах, содержащих ДНК анализируемого фитопатогена, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

7.5.3 В биологических образцах, не содержащих ДНК анализируемого фитопатогена, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

7.5.4 В случае отрицательного результата на наличие ДНК анализируемого фитопатогена и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

7.5.5 При учёте результатов реакции с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат, в случае, если значение для специфики (ДНК анализируемого фитопатогена) попадает в зону неопределённости результатов. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

7.5.6 При получении положительного результата на наличие ДНК анализируемого фитопатогена для отрицательного контрольного образца («К-»), результаты всей постановочной серии выбраковывают. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

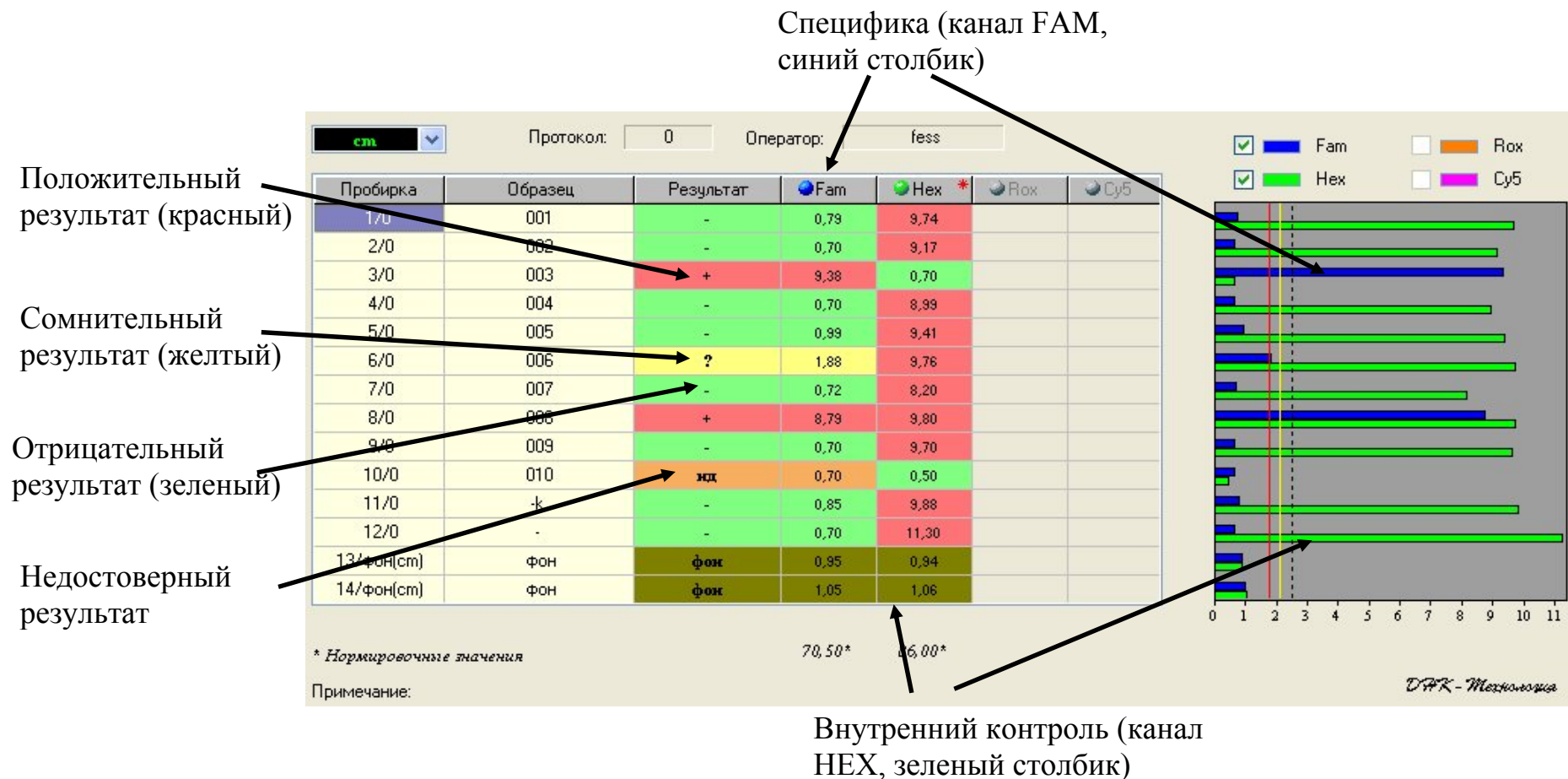


Рисунок 2. Пример определения возбудителя рака томатов (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) с использованием ПЦР-детектора «ДЖИН» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»). Зеленым цветом маркированы отрицательные результаты анализа (ДНК внутреннего контроля детектируется, а ДНК возбудителя рака томатов не детектируется), красным – положительные (детектируется как ДНК внутреннего контроля, так и возбудителя рака томатов), желтым – сомнительные (сигнал флуоресценции ДНК возбудителя рака томатов попадает в зону неопределенности результатов), оранжевым – недостоверные (ДНК внутреннего контроля не детектируется, также как и ДНК возбудителя рака томатов) результаты анализа.