



## 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 | 100 мкл    | 1 пробирка |
| Обратная транскриптаза  | 25 мл      | 1 пробирка |
| ОТ-Буфер                | 50 мкл     | 1 пробирка |

### Комплект реагентов для ПЦР-амплификации

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

*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».

#### I. 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 ( <i>Plum pox potyvirus</i> )  | 268/FAM(Green)                  | 2                      |
| Ризомания сахарной свеклы ( <i>Beet necrotic yellow vein virus</i> )                     | 320/FAM (Green)                 | 3                      |
| Андийский латентный вирус картофеля ( <i>Andean potato latent virus</i> )                | 300/FAM (Green)                 | 2                      |
| Андийский вирус крапчатости картофеля ( <i>Andean potato mottle virus</i> )              | 333/FAM (Green)                 | 2                      |
| Вироид веретеновидности клубней картофеля ( <i>Potato Spindle Tuber Viroid</i> )         | 260/FAM (Green)                 | 2                      |
| Вироид латентной мозаики персика ( <i>Peach latent mosaic viroid</i> )                   | 274/FAM (Green)                 | 3                      |
| Вирус жёлтой курчавости листьев томата * ( <i>Tomato yellow leaf curl begomovirus</i> )  | 229/FAM (Green)                 | 4                      |
| Вирус некротической пятнистости бальзамина ( <i>Impatiens necrotic spot tospovirus</i> ) | 251/FAM (Green)                 | 3                      |
| Вирус бронзовости томата ( <i>Tomato spotted wilt virus</i> )                            | 239/FAM (Green)                 | 3                      |
| Вирус чёрной кольцевой пятнистости картофеля ( <i>Potato black ringspot virus</i> )      | 366/FAM (Green)                 | 3                      |
| Вирус кольцевой пятнистости табака ( <i>Tobacco ringspot virus</i> )                     | 372/FAM (Green)                 | 3                      |
| Вирус кольцевой пятнистости томата ( <i>Tomato ringspot virus</i> )                      | 325/FAM (Green)                 | 3                      |
| Вирус кольцевой пятнистости малины ( <i>Raspberry ringspot virus</i> )                   | 332/FAM (Green)                 | 3                      |
| Т вирус картофеля ( <i>Potato Virus T</i> )  | 172/FAM (Green)                 | 4                      |
| Вирус мозаики пепино ( <i>Pepino mosaic virus</i> )                                      | 314/FAM (Green)                 | 3                      |
| Вирус пожелтения картофеля ( <i>Potato yellowing virus</i> )                             | 200/FAM (Green)                 | 4                      |

|  |                 |   |
|--|-----------------|---|
| Вирус некроза стеблей хризантем<br>( <i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> )                    | 312/FAM (Green) | 3 |
| Вироид задержки роста хризантем<br>( <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> )                           | 234/FAM (Green) | 3 |
| Вирус штриховатой мозаики ячменя<br>( <i>Barley stripe mosaic virus, BSMV</i> )                    | 198/FAM (Green) | 3 |
| Вирус полосатой мозаики пшеницы<br>( <i>Wheat streak mosaic virus, WSMV</i> )                      | 217/FAM (Green) | 3 |
| Вирус мозаики коистра<br>( <i>Brome mosaic virus, BMV</i> )  | 262/FAM (Green) | 3 |
| Вирус карликовой мозаики кукурузы<br>( <i>Maize dwarf mosaic virus, MDMV</i> )                     | 407/FAM (Green) | 3 |
| Вирус розеточной мозаики персика<br>( <i>Peach rosette mosaic virus</i> )                          | 174/FAM (Green) | 2 |
| Вирус коричневой морщинистости плодов томата<br>( <i>Tomato brown rugose fruit virus</i> )         | 112/FAM (Green) | 2 |
| Вирус Нью-Дели курчавости листьев томата<br>( <i>Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV</i> )   | 280/FAM (Green) | 4 |
| Вирус жёлтой карликовости картофеля<br>( <i>Potato yellow dwarf virus</i> )                        | 283/FAM (Green) | 3 |
| Вирус желтой жилки картофеля<br>( <i>Potato yellow vein virus, PVV</i> )                           | 174/FAM (Green) | 4 |
| Вирус черной кольцевой пятнистости косточковых<br>( <i>Prunus necrotic ringspot virus, PNRSV</i> ) | 122/FAM (Green) | 4 |
| Вироид карликовости хмеля<br>( <i>Hop stunt viroid, HSVd</i> )                                     | 120/FAM (Green) | 4 |
| Вирус мозаики хмеля<br>( <i>Hop mosaic virus, HMV</i> )  | 159/FAM (Green) | 4 |
| Вирус мозаики арабис<br>( <i>Arabis mosaic virus, AMV</i> )  | 96/FAM (Green)  | 4 |
| Латентный вирус хмеля<br>( <i>Hop latent virus, HLV</i> )  | 165/FAM (Green) | 4 |
| Скрытый (латентный) вироид хмеля<br>( <i>Hop latent viroid, HLVD</i> )                             | 88/FAM (Green)  | 4 |
| 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 – 12 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).

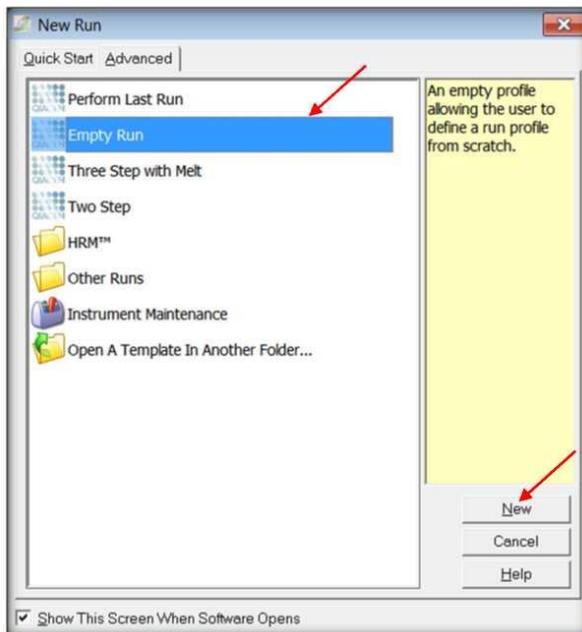
Установите все пробирки в карусель амплификатора, наденьте прижимное кольцо. Проверьте, чтобы карусель была сбалансирована при работе прибора. Номера мест для пробирок в карусели будут соответствовать номерам образцов в программе амплификатора.

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

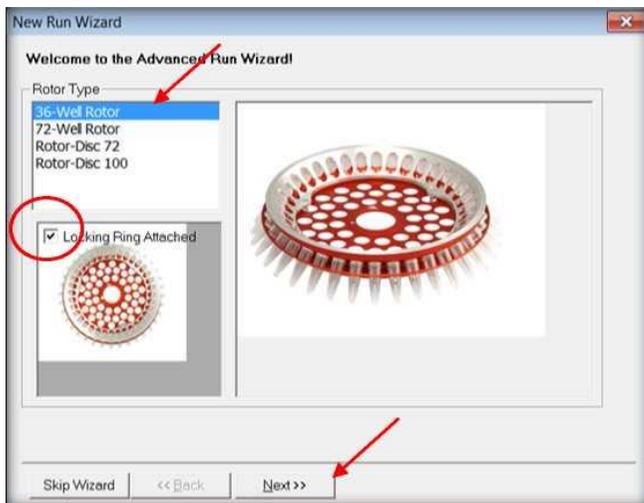
Создание нового файла в программе амплификации необходимо производить в следующем порядке: Откройте программу амплификации, нажмите кнопку «New» в основном меню программы.



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».

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :

Notes :

Reaction Volume (µL): 35

Sample Layout: 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

The reaction volume refers to the total volume of the mixture in the tube.

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

Temperature Profile :

Edit Profile ...

Channel Setup :

| Name    | Source | Detector | Gain |
|---------|--------|----------|------|
| Green   | 470nm  | 510nm    | 5    |
| Yellow  | 530nm  | 555nm    | 5    |
| Orange  | 585nm  | 610nm    | 5    |
| Red     | 625nm  | 660nm    | 5    |
| Crimson | 680nm  | 710hp    | 7    |
| HRM     | 460nm  | 510nm    | 7    |

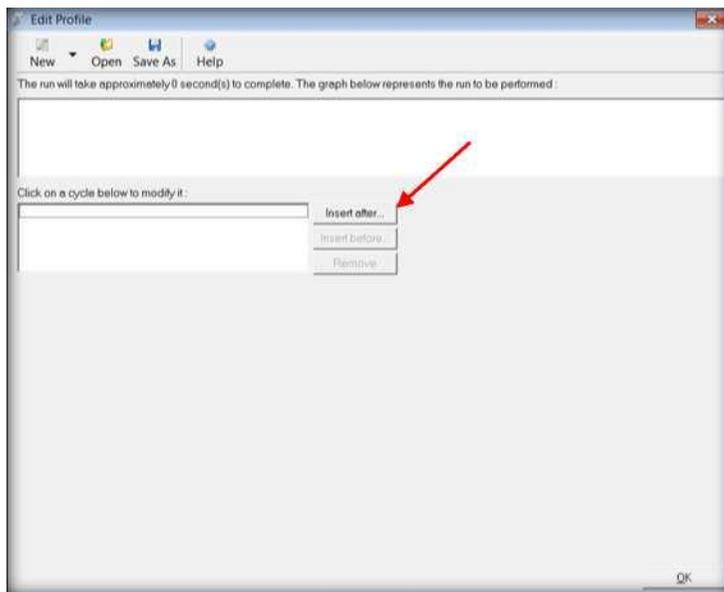
Create New... Edit... Edit Gain... Remove Reset Defaults

Gain Optimisation...

Skip Wizard << Back Next >>

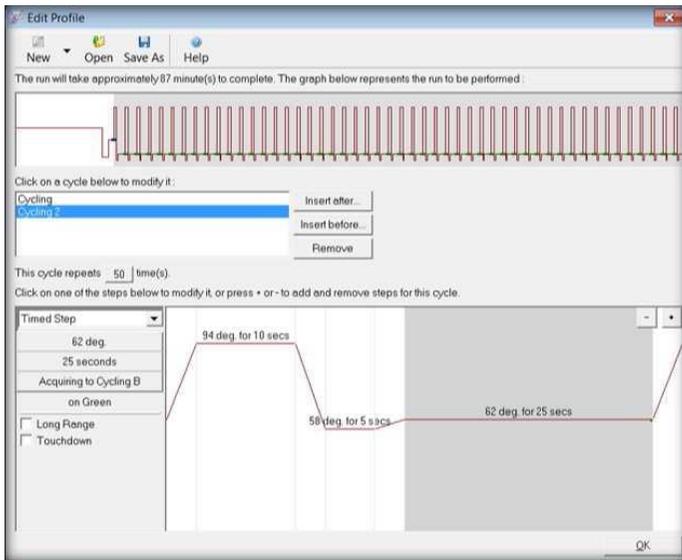
This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

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

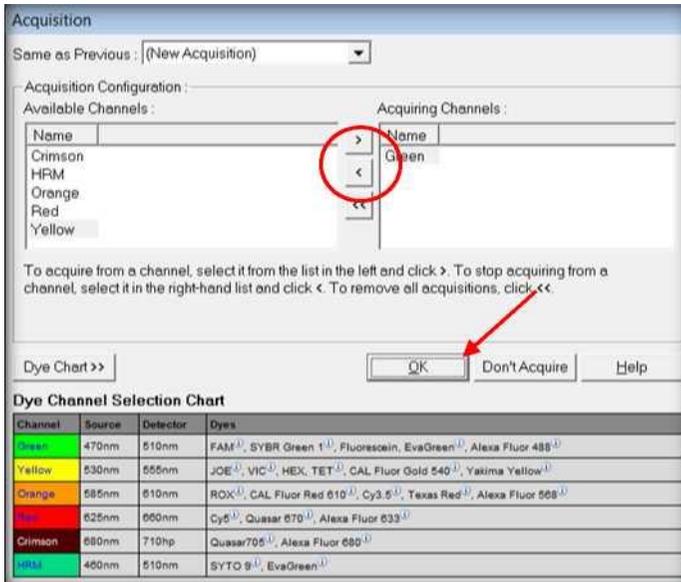


Создайте температурный профиль эксперимента (таблица 2).

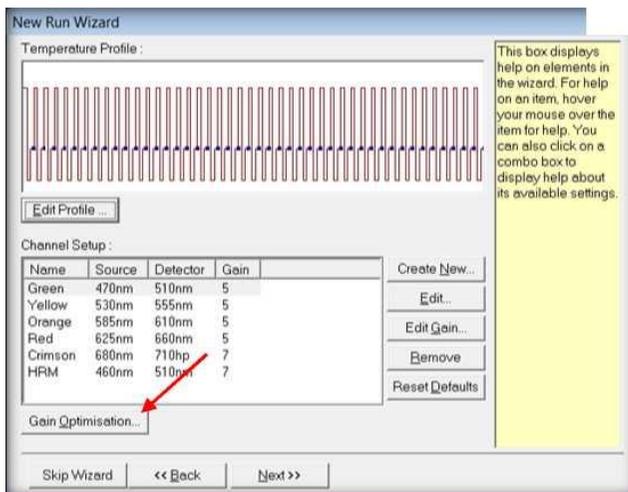
Для этого с помощью «This cycle repeats» задайте количество циклов в соответствующем циклировании. Кнопками «+» или «-» можно добавлять или удалять температурные полки. Для редакции параметров температурных полок выделите мышкой соответствующий шаг и используйте кнопки «deg.» (градусы), «seconds» (время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



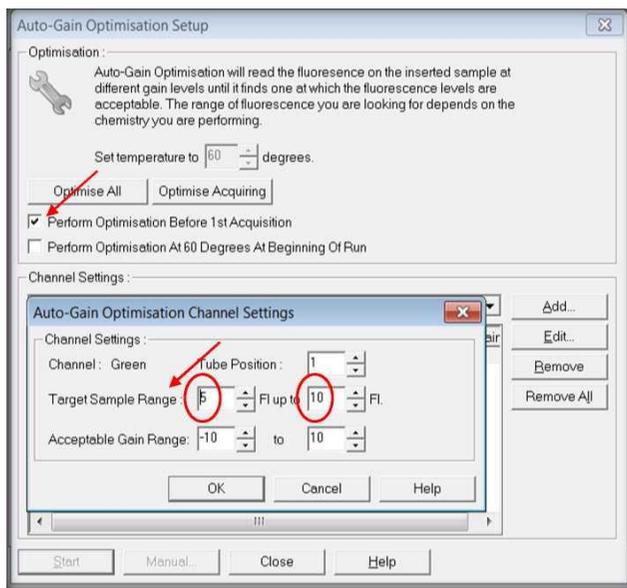
Для добавления канала детекции в соответствующем шаге нажмите кнопку «Not Acquiring» и стрелками переместите название нужных каналов «Green» и «Yellow» в правое окно. После выбора температурного профиля эксперимента нажмите кнопку «OK».



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

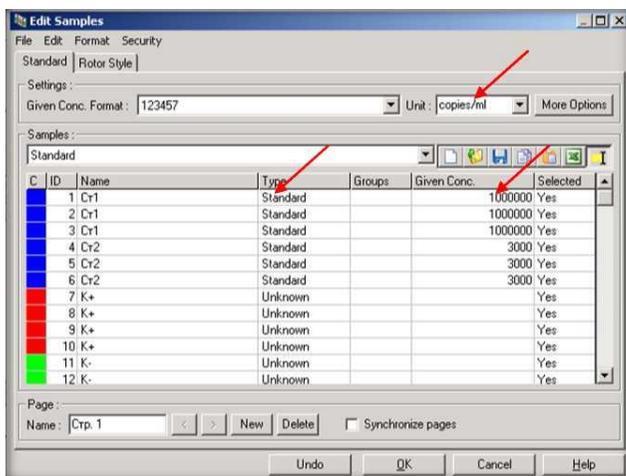


В пункте меню «Channel Settings» выберите каналы «Green» и «Yellow». Установите «Tube Position» 1, «Target Sample Rang» 5 FI up to 10 FI. Установите галочку «Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition», нажмите «Close».



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.



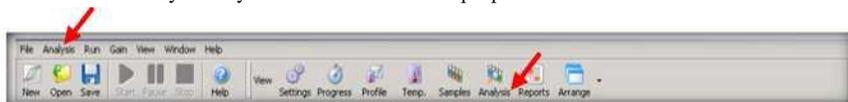
Регистрация сигнала проводится прибором во время амплификации.

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.

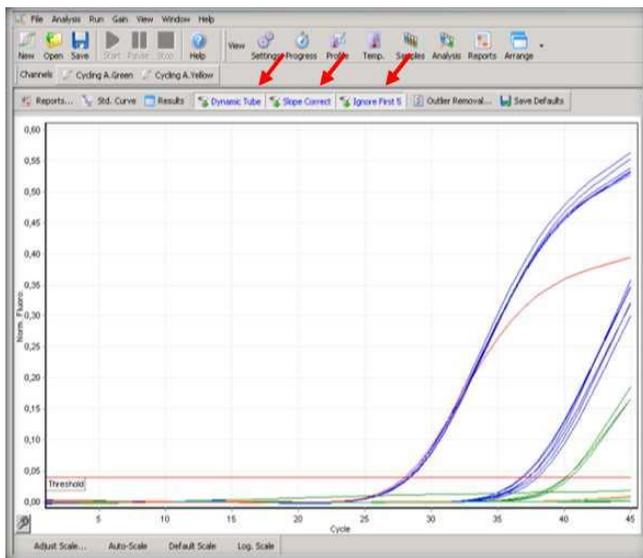


Для проведения анализа необходимо:

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

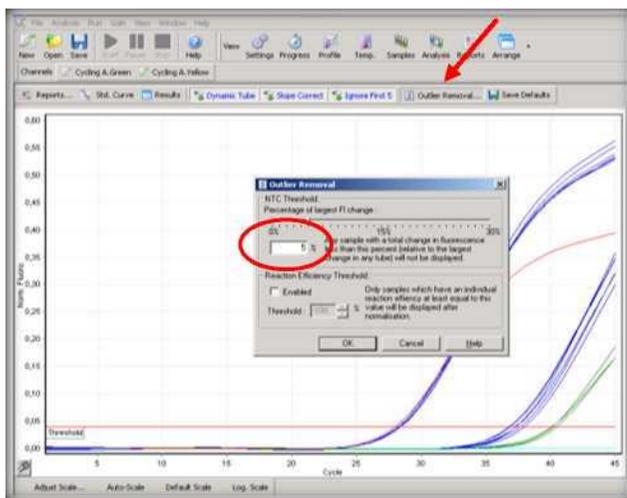


В меню основного окна нажать кнопки «Dynamic tube», «Slope Correct», «Linear Scale».

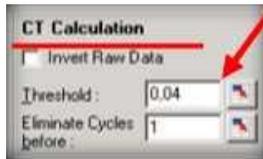


В меню «Ignore First» установить «5».

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).