

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
КАРТОФЕЛЬНОГО ХОЗЯЙСТВА имени А.Г. ЛОРХА**

---

**Диагностика основных патогенов картофеля методом полимеразной  
цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов  
при помощи диагностических наборов производства  
ООО «АгроДиагностика»**

**(Методические указания)**

Москва-2009

Методические указания подготовлены на основе исследований, проведенных научными коллективами Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ГНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха и ООО «АгроДиагностика» в составе: м.н.с. Д.Ю. Рязанцев, к.б.н. Д.Д. Абрамов, к.б.н. Б.В. Анисимов, И.В. Шмыгля, к.б.н. П.Е. Дробязина, проф., чл.-корр. РАСХН С.К. Завриев.

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены Ученым советом ГНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха 10 сентября 2009 г., протокол № 6

Рецензент – к.б.н. С.Н. Кирсанова

Методические рекомендации предназначены для специалистов-фитопатологов и агрономов по защите растений.

## Введение

Картофель, одна из самых распространенных культур в мире, подвержен заболеваниям различной природы: вирусам, микозам, бактериозам и др. На сегодняшний день известно более 100 патогенов, поражающих картофель, отличающихся по вредоносности и величине наносимого экономического ущерба. Потери картофеля от развития вредителей и болезней по разным оценкам составляют от 30 до 50% и более. Инфекционные болезни картофеля распространены практически повсеместно, наблюдается тенденция возрастания их вредоносности в основных картофелепроизводящих регионах. Особенно опасно развитие тяжелых форм вирусного и виroidного заражения многих сортов картофеля, находящихся в хозяйственном и торговом обороте. Одним из последствий такого заражения является постепенное вырождение вегетативно размножаемых сортов картофеля. В связи с этим постоянно возникает необходимость получения безвирусного посадочного материала. Кроме того, особое внимание следует уделять контролю за распространением опасных карантинных патогенов картофеля. Эффективность борьбы с инфекционными болезнями картофеля во многом зависит от их ранней диагностики. Таким образом, своевременная и точная диагностика фитопатогенов картофеля представляется важной практической задачей.

Для обеспечения высокочувствительного и специфичного определения основных фитопатогенов картофеля компания ООО «АгроДиагностика» разработала диагностические наборы, основанные на методе ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов (FLASH-ПЦР, ПЦР «в реальном времени»). Применение таких диагностических наборов позволяет в течение нескольких часов получить надежные, быстрые и достоверные результаты (специфичность анализа составляет более 99%).

## 1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания содержат описание методов качественного определения следующих фитопатогенов картофеля:

- бледная картофельная цистообразующая нематода (*Globodera pallida*, К);
- золотистая картофельная цистообразующая нематода (*Globodera rostochiensis*, К);
- кольцевая гниль картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, К);
- бурая бактериальная гниль картофеля (*Ralstonia solanacearum*, К);
- вириод веретеновидности клубней картофеля (Potato spindle tuber viroid);
- Y вирус картофеля (Potato virus Y);
- X вирус картофеля (Potato virus X);
- S вирус картофеля (Potato virus S);
- M вирус картофеля (Potato virus M);
- A вирус картофеля (Potato virus A);
- вирус метельчатости верхушки картофеля (Potato mop top virus);
- вирус скручиваемости листьев картофеля (Potato leaf roll virus).

(К) – фитопатоген, карантинный на территории Российской Федерации

1.2. Диагностика осуществляется с использованием наборов производства ООО «АгроДиагностика» методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При использовании данных наборов возможны три способа визуализации результатов амплификации: флуоресцентная детекция продуктов амплификации непосредственно после проведения ПЦР методом FLASH (Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization), детекция в ходе реакции методом ПЦР «в реальном времени» (ПЦР-РВ)\*, также возможна детекция в формате гель-

электрофореза. Последний способ детекции не рекомендуется для использования ввиду опасности появления кросс-контаминации образцов.

\* - В настоящее время доступно не для всех наборов.

1.3. Методические указания содержат рекомендации для применения диагностических наборов в лабораториях, обеспечивающих защиту растений картофеля от болезней и вредителей.

1.4. Методические указания будут полезны при осуществлении контроля за качеством посадочного материала картофеля, а также своевременной диагностики выше перечисленных фитопатогенов непосредственно в процессе выращивания картофеля и при закладке его на хранение.

## **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»**.

2.2. Федеральный закон от 15 июля 2000 г. N 99-ФЗ "О карантине растений" (с изменениями от 25 июля 2002 г.).

2.3. ГОСТ 12430-66 «Продукция сельскохозяйственная. Методы отбора проб при карантинном досмотре и экспертизе».

2.4. OEPP/EPPO Bulletin 34, 2004, 155 –157 PM 7/33.

2.5. OEPP/EPPO Bulletin 36, 2006, 99–109 PM 7/59.

2.6. OEPP/EPPO Bulletin 34, 2004, 155 –157 PM 7/21.

2.7. OEPP/EPPO Bulletin 34, 2004, 155 –157 PM 7/40.

2.8. ГОСТ 11856-89 «Картофель семенной. Приемка и методы анализа».

### **3. Принцип метода**

Метод выявления фитопатогенов в растительном материале с помощью диагностических наборов ООО «АгроДиагностика» основан на использовании ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов амплификации непосредственно после завершения реакции (FLASH-ПЦР) или в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

#### ***3.1. Этапы определения фитопатогенов***

Качественное определение присутствия вышеописанных фитопатогенов картофеля с помощью диагностических наборов ООО «АгроДиагностика» состоит из следующих этапов (Приложение 1):

3.1.1. Отбор проб анализируемого образца.

3.1.2. Выделение нуклеиновых кислот: тотальной ДНК из исследуемого образца с помощью реагентов «ПРОБА-ГС» (для культур микроорганизмов, нематод, растительного материала), «ПРОБА-Рапид» (для культур микроорганизмов, нематод) или «ПРОБА-НК» для выделения тотальной РНК (для образцов растительного материала при тестировании на вирусы и вириды). Все реагенты производства ООО «НПО ДНК-Технология».

3.1.2.1. При анализе на вирусы и вириды проводится реакция обратной транскрипции с тотальной РНК с использованием набора для обратной транскрипции (производство ООО «НПО ДНК-Технология»).

3.1.3. Проведение полимеразной цепной реакции для выявления в выделенной ДНК/кДНК генетического материала анализируемого фитопатогена.

3.1.4. Детекция результатов амплификации после проведения ПЦР с помощью ПЦР-детектора «ДЖИН» (производство ООО «НПО ДНК-Технология») в формате FLASH или в формате ПЦР-РВ в ходе реакции.

## **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 детекции в формате гель-электрофореза необходимо соблюдать следующие меры предосторожности: при работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской; запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания, так как высокое напряжение опасно для жизни.

4.2.6. На стадиях диагностики следует использовать только новые

наконечники и пробирки, не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.2.7. Выделение нуклеиновых кислот следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с включенным ламинарным током воздуха.

4.2.8. 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.

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

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

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

## **5. Оборудование, материалы и реактивы**

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1794-03.

### ***5.1. Оборудование и материалы:***

- ДНК амплификатор, детектирующий амплификатор;

- ПЦР-детектор «ДЖИН» (производство ООО «НПО ДНК-Технология»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный с прижимной крышкой, поддерживающий температуру 95°C (например, «ГНОМ» производства ООО «НПО ДНК-Технология»);
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- 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 мл; на 0,6 мл; на 1,5 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.
- насос с колбой-ловушкой/водоструйный насос.

## **5.2. Реактивы.**

5.2.1. Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала «ПРОБА-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология»), включающий (в расчете 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. Комплект реагентов для выделения РНК из растительного материала «ПРОБА-НК» (ООО «НПО ДНК-Технология»), включающий (в расчете на 50 выделений):

- Лизирующий раствор 20 мл 1 флакон
- Реагент для преципитации НК 20 мл 1 флакон
- Промывочный раствор №1 25 мл 1 флакон
- Промывочный раствор №2 15 мл 1 флакон
- Буфер для растворения НК 1,25 мл 2 пробирки

5.2.3. Буфер STE (10мМ TrisCl, рН 8.0, 1мМ EDTA, 0.1М хлорид натрия) для выделения ДНК из цист нематод.

5.2.4. Комплект реагентов для выделения ДНК «ПРОБА-РАПИД» (ООО «НПО ДНК-Технология»), включающий (в расчете на 100 выделений):

реактив «Проба-Рапид», 100 пробирок по 500 мкл.

5.2.5. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК, 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.

Примечание: «ПЦР-буфер» входит только в состав наборов для ПЦР с детекцией в формате FLASH.

Смесь для амплификации, запечатанная парафином, включает: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, флуоресцентные ДНК-зонды, праймеры, внутренний контрольный образец.

## **6. Отбор, хранение и подготовка образцов для анализа**

Отбор, хранение и подготовку образцов для анализа проводят, руководствуясь ГОСТом 11856-89 «Картофель семенной. Приемка и методы анализа» и ГОСТом 12430-66 «Продукция сельскохозяйственная. Методы отбора проб при карантинном досмотре и экспертизе». Для карантинных патогенов отбор, хранение и подготовку образцов для анализа проводят в соответствии со стандартами European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) (<http://www.eppo.org/>, см. стр. 5).

## **7. Порядок проведения анализа**

### ***7.1. Выделение нуклеиновых кислот***

*7.1.1. Выделение ДНК из культур микроорганизмов с помощью «ПРОБА-ГС».*

Соблюдение последовательности операций и аккуратное выполнение выделения ДНК из анализируемого биологического материала являются обязательными.

7.1.1.1. Для обработки нескольких (N) образцов смешать в отдельной пробирке 150x(N+1) мкл лизирующего раствора и 20x(N+1) предварительно ресуспендированного сорбента.

7.1.1.2. Добавить по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом (50 мкл суспензии) и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.1.3. Термостатировать пробирку в течение 20 мин при 50°C, периодически помешивая.

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

7.1.1.5. Удалить надосадочную жидкость.

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

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

7.1.1.8. Удалить надосадочную жидкость.

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

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

7.1.1.11. Удалить надосадочную жидкость.

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

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

7.1.1.14. Удалить надосадочную жидкость.

7.1.1.15. Открыть крышку пробирки и термостатировать пробирку при 50°C в течение 5 мин.

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

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

7.1.1.18. 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.

При выделении ДНК из плотного или загрязненного различными примесями субстрата следует разделить стадии лизиса и сорбции ДНК. В этом случае:

- к материалу добавить 150 мкл лизирующего буфера;
- термостатировать пробирку в течение 20 мин при 50°C, периодически помешивая;
- центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин;
- отобрать надосадочную жидкость в чистую пробирку;
- термостатировать пробирку в течение 10 мин при 50°C, периодически помешивая;
- добавить к ней 20 мкл сорбента, термостатировать пробирку в течение 10 мин при 50°C и продолжать выделение с пункта 7.1.1.4.

*7.1.2. Выделение ДНК из культур микроорганизмов с помощью «ПРОБА-РАПИД».*

Данный ускоренный метод можно применять для быстрого выделения ДНК из бактериальных культур и нематод. При выделении ДНК из материалов, содержащих ингибиторы ПЦР, необходимо использовать набор «ПРОБА-ГС».

7.1.2.1. Перенести 100-500 мкл материала в пробирку пластиковую объёмом 1,5 мл.

Примечание. По возможности не допускать попадания постороннего материала в пробирку с реактивом, а также избытка материала в пробирке (при наличии избыточного материала рекомендуется разбавлять образец путём добавления дополнительно 100-200 мкл реактива «Проба-Рапид»).

7.1.2.2. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

7.1.2.3. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.2.4. Добавить к осадку 500 мкл стерильного физиологического раствора, перемешать.

7.1.2.5. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

7.1.2.6. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.2.7. Добавить к осадку 500 мкл реактива «Проба-Рапид» (содержимое одной пробирки), тщательно перемешать пипетированием, плотно закрыть крышку пробирки.

7.1.2.8. Встряхнуть пробирку «Проба-Рапид» с анализируемым образцом на микроцентрифуге/вортексе в течение 10 сек.

7.1.2.9. Термостатировать пробирку при 98°C в течение 10 мин. Термостат необходимо предварительно прогреть до 98°C. Пробирки должны быть плотно закрыты.

Внимание! При прогревании пробирок возможно открывание крышек! Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат «Гном» производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

7.1.2.10. Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 3 мин. В результате центрифугирования может образоваться осадок голубого цвета.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации. Полученный

препарат ДНК можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток или при температуре -20°C не более 6 месяцев.

Внимание! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо выполнить пп. 7.1.2.8.-7.1.2.10. для отрицательного контрольного образца (новая пробирка с реактивом «Проба-Рапид» из комплекта реагентов для выделения ДНК).

Примечание. При ингибировании ПЦР (отсутствуют полосы специфичного продукта и внутреннего контрольного образца при проведении электрофореза или отсутствует сигнал флуоресценции специфичного продукта и внутреннего контрольного образца) необходимо повторно провести выделение ДНК. Для этого перенести 100 мкл надосадочной жидкости (п. 7.1.2.10.), содержащей выделенную ДНК, в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл и провести выделение ДНК при помощи комплекта реагентов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

### *7.1.3. Выделение ДНК из цист нематод с помощью буфера STE.*

7.1.3.1. Цисты нематод поместить в пробирки.

7.1.3.2. Добавить 50 мкл буфера STE, гомогенизировать.

7.1.3.3. Инкубировать 5 мин на кипящей водяной бане.

7.1.3.4. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.3.5. Надосадочную жидкость использовать для амплификации целевого фрагмента ДНК соответствующей нематоды.

### *7.1.4. Выделение РНК из растительного материала с помощью набора «ПРОБА-НК».*

ВНИМАНИЕ! При планировании пробоподготовки необходимо зарезервировать одну пробирку для получения препарата отрицательного контрольного образца (ОК) путем «выделения РНК» из пробирки, не содержащей анализируемого материала, и дальнейшего проведения реакции обратной транскрипции.

Примечание. В лизирующем растворе допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65°C в течение 15-20 мин.

7.1.4.1. Для вирусов и вириодов сделать высечку кусочка листа (50 мг растительной ткани). Полученный растительный материал гомогенизировать в 400 мкл лизирующего раствора. Гомогенат перенести в пластиковую пробирку.

7.1.4.2. Термостатировать пробирку в течение 20 мин при 65°C.

7.1.4.3. Центрифугировать пробирку 10 мин при 13000 об/мин.

7.1.4.4. Аккуратно, не отбирая осадка, перенести надосадочную жидкость в чистую пластиковую пробирку. Добавить равный объем реагента для преципитации НК и перемешать на вортексе.

7.1.4.5. Центрифугировать пробирку 15 мин при 13000 об/мин.

7.1.4.6. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.4.7. Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирку на вортексе.

7.1.4.8. Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.4.9. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.4.10. Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирку на вортексе.

7.1.4.11. Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.4.12. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.4.13. Открыть крышку пробирки и высушить осадок в течение 5 мин при 65°C.

7.1.4.14. Добавить к осадку 50 мкл буфера для растворения НК, встряхнуть пробирку на вортексе в течение 5-10 сек.

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

7.1.4.16. Центрифугировать пробирку в течение 5 мин при 13000 об/мин. Если образец предполагается хранить, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Препарат РНК готов для постановки реакции обратной транскрипции.

ВНИМАНИЕ! Ввиду нестабильности РНК рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции непосредственно после выделения. РНК можно хранить при  $-70^{\circ}$  не более месяца.

## ***7.2. Проведение реакции обратной транскрипции***

7.2.1. Перед началом работы достать комплект реагентов для обратной транскрипции (ОТ) из морозильной камеры (за исключением обратной транскриптазы), разморозить содержимое пробирок при комнатной температуре, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

7.2.2. В отдельной пластиковой пробирке приготовить смесь ОТ (из расчета на одну пробу): к 2 мкл ОТ-буфера добавить 1 мкл суммы праймеров и 0,5 мкл обратной транскриптазы, тщательно перемешать на вортексе. При приготовлении смеси ОТ расчет проводить по количеству анализируемых образцов с учетом отрицательного контрольного образца (N) и запасом на одну пробу (N+1).

Примечание. Обратную транскриптазу следует достать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3. Перенести пробирку со смесью ОТ в помещение, предназначенное для выделения РНК.

7.2.4. Промаркировать (N) чистых пластиковых пробирок.

7.2.5. Внести в соответствующие пробирки по 16,5 мкл препарата РНК, добавить по 3,5 мкл смеси ОТ.

Примечание. Рекомендуется использовать наконечники с фильтром.

7.2.6. Встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 сек и осадить капли кратковременным центрифугированием.

7.2.7. Инкубировать пробирки при температуре 40°C в течение 40 мин, а затем при температуре 95°C в течение 10 мин.

Примечание. Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

7.2.8. Осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

7.2.9. Во все пробирки добавить по 80 мкл буфера для разведения кДНК, тщательно перемешать пробирки на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

Полученный препарат кДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

ВНИМАНИЕ! Препарат кДНК хранить при -20°C.

### ***7.3. Подготовка и проведение ПЦР***

7.3.1. Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учетом пробирок для отрицательного («К-») и положительного («К+») контрольных образцов. При работе с наборами реагентов для ПЦР в формате FLASH необходимо дополнительно промаркировать две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.

Примечание. Пробирки для ПЦР в реальном времени нельзя маркировать на центральной части крышки, так как через нее происходит детекция сигнала.

7.3.2. При работе с набором реагентов для ПЦР в режиме «реального времени» необходимо предварительно создать протокол анализа с использованием программного обеспечения, поставляемого вместе с детектирующим амплификатором.

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

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

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

7.3.6. 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.

7.3.7. 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.

Примечание. В случае возникновения проблем с пробоподготовкой и проведением ПЦР рекомендуется дополнительно в одну из пробирок добавлять стерильную воду.

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

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.

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

7.3.10. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР с учетом объема реакционной смеси 35 мкл. Выбор программы амплификации осуществляется в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. Длины продуктов и программы ПЦР-амплификации ДНК/кДНК

Тест-системы для детекции основных патогенов картофеля	Длина продукта амплификации, п.н.	Программа амплификации (номер соответствующей таблицы, следующей ниже)		
		FLASH/форез	ДТ-322/96	iCycler iQ
Бледная картофельная цистообразующая нематода	140	3	5	6
Золотистая картофельная цистообразующая нематода	300	3	5	6
Кольцевая гниль картофеля	135	3	5	6
Бурая бактериальная гниль	260	2	4	7
Вироид веретеновидности клубней картофеля	320	2	-	-
Y вирус картофеля	241	2	-	-
X вирус картофеля	167	2	-	-
S вирус картофеля	278	2	-	-
M вирус картофеля	160	2	-	-
A вирус картофеля	221	2	-	-
Вирус метельчатости верхушки картофеля	264	2	-	-
Вирус скручиваемости листьев картофеля	260	2	-	-
Внутренний контроль (ВК)	560	-	-	-

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

Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
93	90	1
93	20	5
64	5	
67	5	40
93	1	
64	5	
67	5	
10	хранение	

Внимание! При использовании других амплификаторов необходимо обратиться к представителю компании для уточнения программы амплификации

Таблица 3. Режим амплификации для амплификатора «Терцик» алгоритм регулирования: «точный»

Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
93	90	1
93	5	5
67	15	
93	1	40
67	15	
10	хранение	

Внимание! При использовании других амплификаторов необходимо обратиться к представителю компании для уточнения программы амплификации

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

Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
80	30	1
94	60	
94	10	50
64*	20	
67	20	
10	хранение	

\*- регистрация результатов

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

Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
80	30	1
94	90	
94	30	5
67*	45	
94	10	45
67*	45	
10	хранение	

\*- регистрация результатов

Таблица 6. Формат «Real-time» Режим амплификации для iCycler iQ

Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
Режим dynamicwfm.tmo		
80	30	1
94	90	
94	30	5
67	45	
80*	30	2
Программа амплификации		
94	10	45
67*	45	
10	хранение	

\*- регистрация результатов

Таблица 7. Формат «Real-time» Режим амплификации для iCycler iQ

Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
Режим dynamicwfm.tmo		
80	30	1
94	60	
94	20	10
64	30	
64*	20	2
Программа амплификации		
94	10	40
64*	20	
67	20	
10	хранение	

\*- регистрация результатов

#### ***7.4. Регистрация результатов амплификации***

*7.4.1. Регистрация результатов амплификации в формате ПЦР «в реальном времени».*

При использовании детектирующего амплификатора с наборами реагентов для ПЦР в режиме «реального времени» детекция и анализ результатов проводятся автоматически после завершения реакции программным обеспечением, поставляемым вместе с детектирующим амплификатором (пример детекции см. приложение 3). При необходимости анализ результатов может проводиться вручную. При этом следует руководствоваться инструкцией к амплификатору.

*7.4.2. Регистрация результатов амплификации в формате FLASH-ПЦР.*

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

7.4.2.1. Учет и интерпретация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором (пример детекции см. приложение 2).

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

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

7.4.2.4. 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.

7.4.2.5. 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.

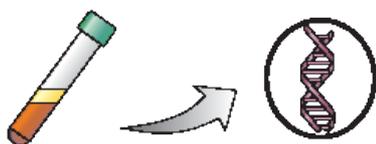
7.4.2.6. При получении положительного результата на наличие ДНК анализируемого фитопатогена для отрицательного контрольного образца («К-»), результаты всей постановочной серии выбраковывают. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

### **Заключение**

Наборы, производимые компанией ООО «АгроДиагностика», соответствуют всем требованиям, применяемым к современным диагностическим системам: позволяют с высокой чувствительностью и специфичностью диагностировать соответствующие патогены картофеля; применение флуоресцентной детекции результатов амплификации позволяет максимально автоматизировать и стандартизировать этапы анализа, а также сократить количество манипуляций в пределах каждого этапа. Диагностические наборы ООО «АгроДиагностика» могут быть рекомендованы к применению для лабораторий, обеспечивающих защиту растений картофеля от болезней и вредителей

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

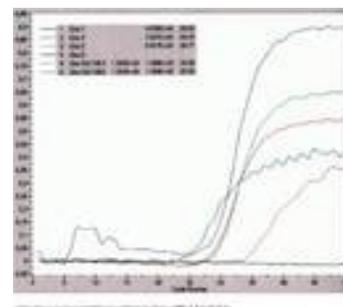
1. Выделение тотальной ДНК или РНК



1.1. Обратная транскрипция



2. Полимеразная цепная реакция  
с детекцией результатов в  
режиме реального времени



2. Полимеразная  
цепная реакция

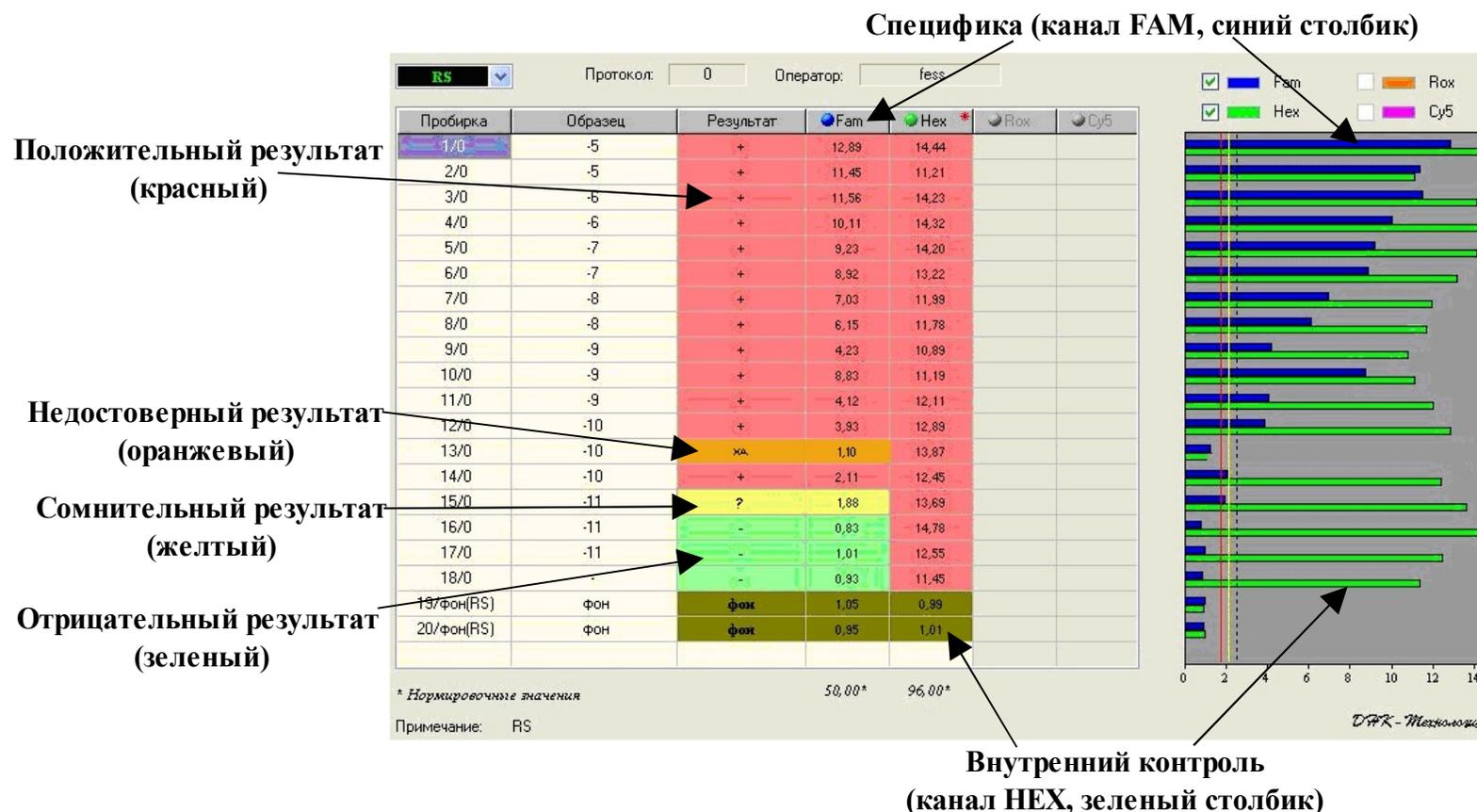


3. Детекция результатов в формате  
FLASH

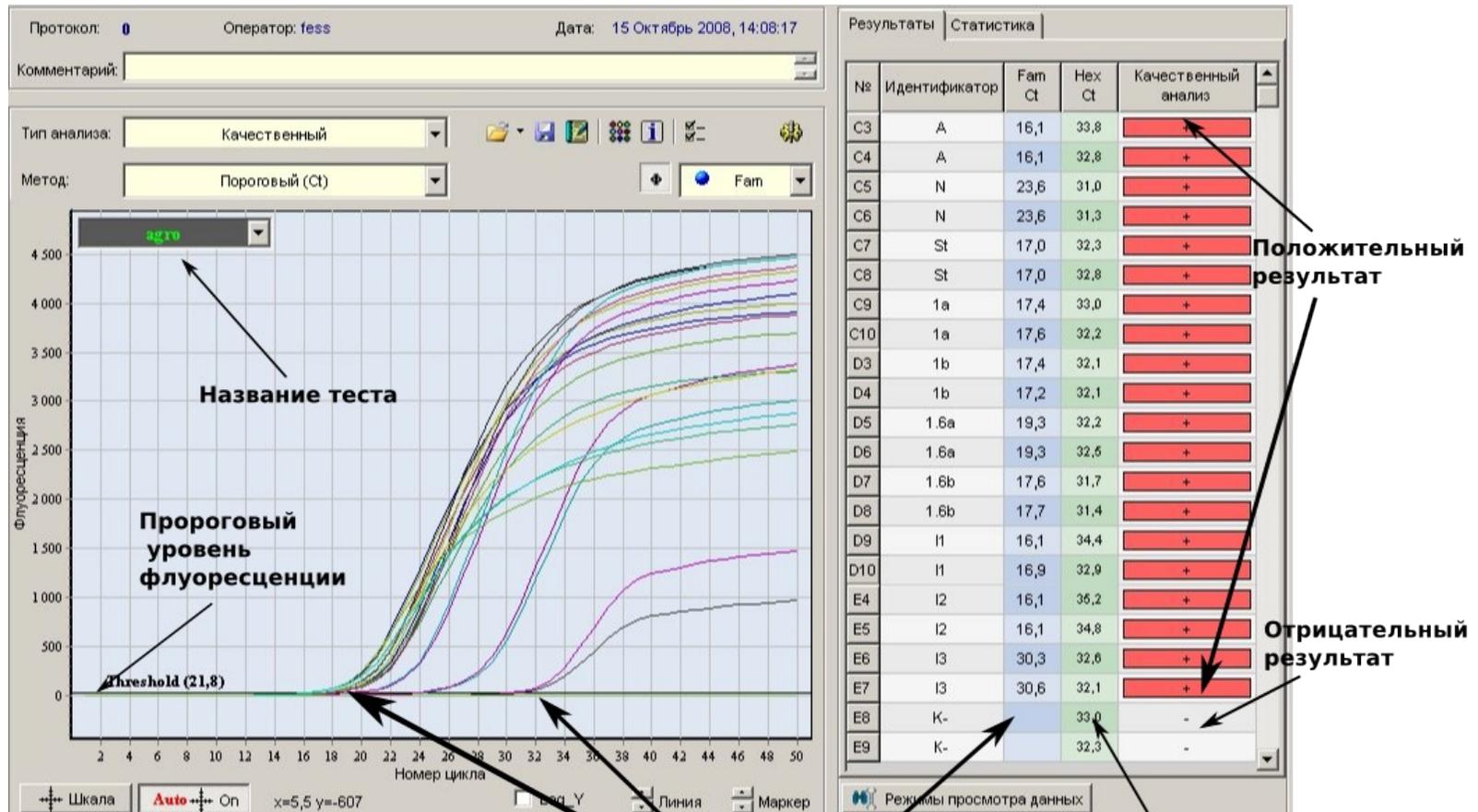


**Пример определения возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля (*Ralstonia solanacearum*) с использованием ПЦР-детектора «ДЖИН» (ООО «НПО ДНК-Технология»).**

Зеленым цветом маркированы отрицательные результаты анализа (ДНК внутреннего контроля детектируется, а ДНК возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля не детектируется), красным – положительные (детектируется как ДНК внутреннего контроля, так и возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля), желтым – сомнительные (сигнал флуоресценции ДНК возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля попадает в зону неопределенности результатов), оранжевым – недостоверные (ДНК внутреннего контроля не детектируется, также как и ДНК возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля) результаты анализа.



**Пример определения возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля (*Ralstonia solanacearum*) с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»).**



Положительный результат

Отрицательный результат

Номер цикла при пороговом уровне флуоресценции для канала FAM (специфика)

Номер цикла при пороговом уровне флуоресценции для канала HEX (ВК)