

Краткая инструкция к комплектам реагентов для проведения ПЦР-амплификации ДНК фитопатогенов (форматы «Flash», «Real-Time»)
Редакция № 9 от 29.03.2024
Состав (на 50 определений)

Реактив	Количество	
Реакционная смесь, запечатанная парафином	20 мкл	50 пробирок
Минеральное масло	1000 мкл	1 пробирка
Раствор Таq-полимеразы	500 мкл	1 пробирка
Положительный контрольный образец ДНК	75 мкл	1 пробирка
ПЦР-буфер*	200 мкл	1 пробирка

***- 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 Таq-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 «Flash»: с помощью ПЦР-детектора «Джин» согласно инструкции к прибору или с помощью геле-электрофореза. (см. табл.2-3 и инструкции для проведения геле-электрофореза). Пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10; 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	ДТ-96/ ДТ-322/ Дтпрайм/ ДТлайт	CFX96	ABI 7500
Сосновые древесные нематоды (<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , <i>B. mucronatus</i>)**	280/FAM	2	4	12	6
Бактериальный рак томатов (возб. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>)	180/FAM	2	4	12	6
Кольцевая гниль картофеля (возб. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>)	136/FAM	3	5	13	7
Бактериальный ожог плодовых (возб. <i>Erwinia amylovora</i>)	257/FAM	2	4	12	6
Водянистая гниль плодов (возб. <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>)	314/FAM	2	4	12	6
Бледная картофельная цистообразующая нематода (<i>Globodera pallida</i>)	136/FAM	3	5	13	7
Золотистая картофельная цистообразующая нематода (<i>Globodera rostochiensis</i>)	304/FAM	3	5	13	7
Аскохитозы (возб. грибы <i>Ascochyta/Didymella/Phoma</i>)	230/FAM	2	4	12	6
Некроз сердцевин стейля томата (возб. <i>Pseudomonas corrugata</i>)	240/FAM	2	4	12	6
Бурая бактериальная гниль (возб. <i>Ralstonia solanacearum</i>)	256/FAM	2	4	12	6
Чёрная бактериальная пятнистость томатов (возб. <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , сун. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>)	294/FAM	2	4	12	6
Бактериальный вилт кукурузы (возб. <i>Pantoea stewartii</i>)	215/FAM	2	4	12	6
Септориоз злаков (возб. <i>Septoria tritici</i> , <i>Stangospora (Septoria) nodorum</i>)**	250/FAM	2	4	12	6
Угловатая пятнистость листьев (возб. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lacydmani</i>)	162/FAM	2	5	13	6
Фузариоз злаков – (возб. <i>Fusarium graminearum</i>)	335/FAM	2	4	12	6
Фузариоз злаков – (возб. <i>Fusarium culmorum</i>)	333/FAM	2	4	12	6
Фузариоз злаков – (возб. <i>Fusarium sporotrichioides</i>)	310/FAM	2	4	12	6
Фузариоз злаков – (возб. <i>Fusarium langsethiae</i>)	306/FAM	2	4	12	6
Фузариоз злаков – (возб. <i>Fusarium poae</i>)	299/FAM	2	4	12	6
Фузариоз злаков – (возб. <i>Fusarium avenaceum</i>)	236/FAM	2	4	12	6
Фузариоз злаков – (возб. <i>Fusarium tricinctum</i>)	235/FAM	2	4	12	6
F. graminearum, F. culmorum — токсины DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, FUSX, ZEA	410/FAM	2	4	12	6
F. sporotrichioides, F. langsethiae — токсины T-2, HT-2, DAS, NEO, ZEA	333/FAM	2	4	12	6
F. poae — токсины NIV, FUSX, T-2, HT-2, DAS, ZEA	188/FAM	2	4	12	6
F. avenaceum, F. tricinctum — токсины MON, BEA, ENN	289/FAM	2	4	12	6
Фузариоз злаков (возб. <i>Fusarium cerealis</i>)	300/FAM	10	16	14	9
Плодовая средиземноморская муха (<i>Ceratitidis capitata</i>)	300/FAM	10	16	14	9

Фомопсис подсолнечника – возб. <i>Diaporthe helianthi</i> (<i>Phomopsis helianthi</i>)	331/FAM	2	4	12	6
Гниль сахарной свёклы (возб. <i>Pseudomonas syringae</i>)	170/FAM	2	4	12	6
Бактериальная пятнистость тыквенных культур (возб. <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>Candidatus Phytoplasma mali</i>)	260/FAM	-	15	11	8
Фитоплазма истощения груши – (<i>Candidatus Phytoplasma pyri</i>)	260/FAM	-	15	11	8
Бактериальный ожог риса (возб. <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>)	259/FAM	-	16	14	9
Сосудистый бактериоз капусты (возб. <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>)	270/FAM	-	16	14	9
Вертициллез хмеля (возб. <i>Verticillium albo-atrum</i>)	138/FAM	-	16	14	9
Тифулёз хмеля (возб. <i>Typhula idahoensis</i>)	155/FAM	-	16	14	9
Тифулёз хмеля (возб. <i>Typhula ishikariensis</i>)	116/FAM	-	16	14	9
Мучнистая роса хмеля (возб. <i>Podosphaera macularis</i>)	188/FAM	-	16	14	9
Черная ножка картофеля (возб. <i>Pectobacterium parmentieri</i>)	218/FAM	-	16	14	9
Ложная мучнистая роса хмеля (возб. <i>Pseudoperonospora humuli</i>)	223/FAM	-	16	14	9
Ризоктониоз хмеля (возб. <i>Helicobasidium purpureum</i>)	117/FAM	-	16	14	9
Внутренний контроль (тест-системы на FLASH)	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	
67°C	15 с	40
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°C	1 мин	1
94°C	10 с	50
60°C *	15 с	
67°C	20 с	
10°C	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°C	2 мин	1
94°C	10 с	45
55°C *	30 с	
72°C	10 с	
10°C	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°C	2 мин	1
94°C	15 с	45
55°C *	20 с	
72°C	15 с	
10°C	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°C	1 мин	1
94°C	10 с	45
60°C *	15 с	
67°C	10 с	
10°C	хранение	

- Примечание: инструкции по использованию наборов при работе с прибором RotorGene-6000 доступны в электронном формате по адресу: ООО [АгроДиагностика \(www.agrodiagnostica.com\)](http://www.agrodiagnostica.com)