



Краткая инструкция к комплектам реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК фитопатогенных вирусов (форматы «Flash», «Real-Time»)

Редакция № 9 от 29.03.2024

Состав (на 50 определений)

Комплект реагентов для обратной транскрипции (с данным набором не поставляется, приобретается отдельно)

Реактив	Количество	
Праймеры ОТ-RANDOM	50 мкл	1 пробирка
Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
ОТ-Буфер	200 мкл	1 пробирка

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации

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

*- в комплекте реагентов для FLASH.

Примечание: комплект реагентов для обратной транскрипции является универсальным для всех комплектов для ПЦР-амплификации.

Инструкция по применению

Комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции и ПЦР-амплификации кДНК фитопатогенных вирусов рекомендуется использовать совместно с комплектом реагентов для выделения РНК «Проба-НК».

I. Постановка обратной транскрипции

- Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 0,6 мл с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца «К-».
- Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке 2,0х(N+1) мкл ОТ-буфера, 1,0х(N+1) мкл праймеров ОТ-RANDOM (ОТ-PPV)+дНТФ и 0,5х(N+1) мкл обратной транскриптазы, где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.
- Внесите по 3,5 мкл ОТ-смеси в промаркированные пробирки.
- Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.
- 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.
- Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
- Термостатируйте пробирки при 40°C в течение 40 мин, затем инактивируйте обратную транскриптазу прогреванием при 95°C в течение 10 мин.
- Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
- Во все пробирки внесите по 80 мкл буфера для растворения из комплекта реагентов для выделения РНК «НК-Агро».
- Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
- 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

- 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 «Джин» (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 кДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»). В пробирки, маркированные «К-» и «ФОН», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку и реакцию обратной транскрипции, 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 таблицах 2-5, с учетом объема реакционной смеси 35 мкл и модели амплификатора.

III. Проведение детекции и учет результатов ПЦР-амплификации кДНК

- Формат «Flash»: с помощью ПЦР-детектора «Джин» согласно инструкции к прибору или с помощью гель-электрофореза. (см. табл.2 и инструкцию для проведения гель-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»), ABI 7500 или iCycler iQ (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями к приборам.

Таблица 1. Длины продуктов ПЦР-амплификации и программа амплификации

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пн	Программа амплификации			
		FLASH	ДТ-96/ ДТ-322/ Дтпрайм/ Дтлайт/ АНК-32	CFX96	ABI 7500
Вирус скручивания листьев картофеля (<i>Potato Leafroll Virus</i>)	260/FAM	2	3	7	4
Вирус метельчатости верхушки картофеля (<i>Potato mop-top virus</i>)	264/FAM	2	3	7	4
A вирус картофеля (<i>Potato Virus A</i>)	221/FAM	2	3	7	4
M вирус картофеля (<i>Potato Virus M</i>)	160/FAM	2	3	7	4
S вирус картофеля (<i>Potato Virus S</i>)	278/FAM	2	3	7	4
X вирус картофеля (<i>Potato Virus X</i>)	167/FAM	2	3	7	4
Y вирус картофеля (<i>Potato Virus Y</i>)	241/FAM	2	3	7	4
Вироид веретеновидности клубней картофеля (<i>Potato Spindle Tuber Viroid</i>)	260/FAM	2	3	7	4
Актин картофеля	300/FAM	2	3	7	4
Ризомания сахарной свеклы (<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>)	320/FAM	2	3	7	4
Вирус шарки сливы (<i>Plum pox potyvirus</i>)	268/FAM	2	3	7	4
Андийский латентный вирус картофеля (<i>Andean potato latent virus</i>)	300/FAM	2	3	7	4
Андийский вирус крапчатости картофеля (<i>Andean potato mottle virus</i>)	333/FAM	2	3	7	4
Вирус чёрной кольцевой пятнистости картофеля (<i>Potato black ringspot virus</i>)	366/FAM	-	6	5	9
Вирус кольцевой пятнистости табака (<i>Tobacco ringspot virus</i>)	372/FAM	-	6	5	9
Вирус кольцевой пятнистости томата (<i>Tomato ringspot virus</i>)	325/FAM	-	6	5	9
Вирус кольцевой пятнистости малины (<i>Raspberry ringspot virus</i>)	332/FAM	-	6	5	9
Вироид латентной мозаики персика (<i>Peach latent mosaic viroid</i>)	274/FAM	-	6	5	9
Вирус жёлтой курчавости листьев томата * (<i>Tomato yellow leaf curl begomovirus</i>)	229/FAM	-	11	8	10
Вирус некротической пятнистости бальзамина (<i>Impatiens necrotic spot tospovirus</i>)	251/FAM	-	6	5	9
Вирус бронзовости томата (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)	239/FAM	-	6	5	9
T вирус картофеля (<i>Potato Virus T</i>)	172/FAM	-	6	8	10
Вирус пожелтения картофеля (<i>Potato yellowing virus</i>)	200/FAM	-	6	8	10
Вирус некроза стеблей хризантем (<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>)	312/FAM	-	6	5	9
Вироид задержки роста хризантем (<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>)	234/FAM	-	6	5	9
Вирус жёлтой карликовости картофеля (<i>Potato yellow dwarf virus</i>)	283/FAM	-	6	5	9
Вирус мозаики кобры (<i>Brome mosaic virus, BMV</i>)	262/FAM	-	11	8	10
Вирус штриховатой мозаики ячменя (<i>Barley stripe mosaic virus, BSMV</i>)	198/FAM	-	11	8	10
Вирус полосатой мозаики пшеницы (<i>Wheat streak mosaic virus, WSMV</i>)	217/FAM	-	11	8	10
Вирус карликовой мозаики кукурузы (<i>Maize dwarf mosaic virus, MDMV</i>)	450/FAM	-	6	5	9
Вирус розеточной мозаики персика (<i>Peach rosette mosaic virus</i>)	174/FAM	-	3	7	4
Вирус коричневой морщинистости плодов томата (<i>Tomato brown rugose fruit virus</i>)	112/FAM	-	3	7	4
Вирус мозаики пепино (<i>Pepino mosaic virus</i>)	310/FAM	-	6	5	9
Вирус Нью-Дели курчавости листьев томата (<i>Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV</i>)	280/FAM	-	11	8	10
Вирус жёлтой жилки картофеля (<i>Potato yellow vein virus, PVV</i>)	174/FAM	-	11	8	10
Вирус черной кольцевой пятнистости косточковых (<i>Prunus necrotic ringspot virus, PNRSV</i>)	122/FAM	-	11	8	10
Вироид карликовости хмеля (<i>Hop stunt viroid, HSVd</i>)	120/FAM	-	11	8	10
Вирус мозаики хмеля (<i>Hop mosaic virus, HMV</i>)	159/FAM	-	11	8	10
Вирус мозаики арабис (<i>Arabis mosaic virus, AMV</i>)	96/FAM	-	11	8	10
Латентный вирус хмеля (<i>Hop latent virus, HLV</i>)	165/FAM	-	11	8	10
Скрытый (латентный) виroid хмеля (<i>Hop latent viroid, HLVd</i>)	88/FAM	-	11	8	10
Внутренний контроль (тест-системы на FLASH)	560/HEX	-	-	-	-

* - ДНК-вирус, этап обратной транскрипции не нужен.

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.

Таблица 2. Форматы «Flash»

Режим амплификации для амплификатора «Терцик» алгоритм регулирования: «точный»

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин	1
94°C 64°C 67°C	20 с 5 с 5 с	5
94°C 64°C 67°C	1 с 5 с 5 с	40
10°C	Хранение	

* – регистрация результатов

Таблица 3. Формат «Real-time»

Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/Дтпрайм/Дтлайт/АНК

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

* – регистрация результатов

Таблица 4. Формат «Real-time»

Режим амплификации для Applied Biosystems 7500

Температура	Время	Количество циклов
60°C	1 мин	1
94°C	1 мин 30 с	1
94°C	20 с	45
64°C*	30 с	
60°C	1 мин	1
10°C	Хранение	

* – регистрация результатов

Таблица 5. Формат «Real-time»

Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/Дтпрайм/Дтлайт/АНК/CFX96

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

* – регистрация результатов

Таблица 6. Формат «Real-time»

Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/Дтпрайм/Дтлайт/АНК/CFX96

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	

* – регистрация результатов

Таблица 7. Формат «Real Time». Режим амплификации для амплификатора BioRad CFX96

Температура	Время	Количество циклов
94°C	3 мин	1
94°C	15 с	
64°C*	45 с	45

* – регистрация результатов

Таблица 8. Формат «Real-time» Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322 /Дтпрайм /Дтлайт/ BioRad CFX96

Температура	Время	Количество циклов
94°C	1 мин	1
94°C	10 с	
60°C*	15 с	45
64°C	20 с	

* – регистрация результатов

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	
55°C*	15 с	40
72°C	20 с	
60°C*	1 мин	1

* – регистрация результатов

Таблица 10.

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	
60°C*	15 с	40
72°C	20 с	
60°C*	1 мин	1

* – регистрация результатов

Таблица 11. Формат «Real-time»

Режим амплификации для ДТ-96/ДТ-322/Дтпрайм/Дтлайт/АНК/CFX96

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	

* – регистрация результатов

- 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)