

#### Краткая инструкция к комплектам реагентов для проведения ПЦРамплификации ДНК фитопатогенов (форматы «Real-Time», Rotor-Gene 6000)

	Состав (на 50 определений)
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

# Инструкция по применению <u>I. Постановка амплификации</u>

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 ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»). В пробирки, маркированные «К-», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку 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.

# <u>II. Проведение детекции и учет результатов ПЦР-амплификации ДНК</u>

• <u>Формат «Форез»:</u> результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (см. табл.2-3 и инструкцию для проведения гель-электрофореза).

# • <u>Формат «Real-time».</u>

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.

Создание нового файла в программе амплификации необходимо производить в следующем порядке:

Откройте программу амплификации, нажмите кнопку «New» в основном меню программы.



8 53

В появившемся окне выберите шаблон запуска «Advanced». Выделите «Empty Run», нажмите кнопку «New».

35

uick Start Advanced	
Perform Last Run  Empty Run  Three Step with Melt  Two Step  HRM™  Other Runs  Nother Runs  Open A Template In Another Folder	An empty profile allowing the user to define a run profile from scratch.
	New
	Cancel
	Help

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».

New Run Wizard		×
Welcome to the Advances Rotor Type 36-W4E Rotor 72-Wel Rotor Rotor-Disc 72 Rotor-Disc 100	Run Wizard	
	/	
Skip Wizard << Bed	Next>>	

В открывшемся окне задайте имя оператора, описание эксперимента и объём реакционной смеси (35 мкл). Нажмите кнопку «Next».

This screen displicing Next when	ys miscellaneous options for the run. Complete the fields, you are ready to move to the next page.	The reaction volume refers to the total volume of the mixture
Operator :	¥	in the tube.
Notes :		-
Reaction Volume (μL):	35	

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

	un Drafile :				President and a second state of the second state
Edit Prof	file	/			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
Name	Source	Detector	Gain	Create New	1
Green	470nm	510nm	5	000-000	
Yellow	530nm	555nm	5	Edit	
Yellow Orange Red	530nm 585nm	555nm 610nm	5	Edit	
Yellow Orange Red Crimson	530nm 585nm 625nm 680nm	555nm 610nm 660nm 710hp	55577	Edit Edit <u>G</u> ain Bemove	
Yellow Orange Red Crimson HRM	530nm 585nm 625nm 680nm 460nm	555nm 610nm 660nm 710hp 510nm	55577	Edit Edit <u>G</u> ein <u>B</u> emove Reset <u>D</u> efault:	

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

Edit Pr	ofile						
UII New	• Open	Save As	@ Help				
The run wi	l teke appro	oximately 0 s	econd(s) to com	plete. The graph belo	w represents the ru	in to be performed :	
-							
					/		
lick on a	ovela balov	e to modifie it					
000	cy can be for	rio mooily a		losert afte	и., 🧖		
				I Insent Iserto	10.		
				Remov	61 I.		
							QK

Создайте температурный профиль эксперимента (таблица 1-4).

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).

Таблица 1. Длины продуктов ПЦР-амплификации ДНК (\*\*- отдельные тест-системы на каждый вид)

	каждый вид)	
Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пн/	Программа амлификации
····	канал детекции	(Таблица №)
Бактериальный ожог плодовых		
(возб.	257/FAM/Green	2
Erwinia amylovora)		
Кольцевая гниль картофеля (возб.		
Clavibacter michiganensis subsp.	136/FAM/Green	3
sepedonicus)		
Бледная картофельная		
цистообразующая нематода	136/FAM/Green	3
(Globodera pallida)		
Золотистая картофельная		
цистообразующая нематода	304/FAM/Green	3
(Globodera rostochiensis)		
Бурая бактериальная гниль	256/FAM/Green	2
(возб. Ralstonia solanacearum)	230/1 Alti/Green	2
Сосновые древесные нематоды		
(Bursaphelenchus xylophilus, B.	280/FAM/ Green	2
mucronatus)**		
Бактериальный вилт кукурузы	215/FAM/ Green	2
(возб. Pantoea stewartii)		£
Фомопсис подсолнечника –		
Возб.	331/FAM/Green	2
Diaporthe helianthi (Phomopsishelianthi)		
Плодовая средиземноморская муха	300/ FAM/Green	4
(Ceratitis capitata)		
Бактериальная пятнистость		
тыквенных культур (возб.	255/FAM/Green	4
Acidovorax citrulli)		
Фитоплазма золотистого		_
пожелтения винограда (Candidatus	330/FAM/Green	5
Phytoplasma Vitis)		
Фитоплазма пролиферации яблони	260/FAM/Green	5
(Apple proliferation phytoplasma)		-
Фитоплазма истощения груши –	260/FAM/Green	5
(Pear decline phytoplasma)		-
Бактериальный ожог риса (возб.	259/FAM/Green	2
xantnomonas oryzae pv. oryzae)		
Сосудистый бактериоз капусты		
(603b. Xanthomonas campestris pv.	270/FAM/Green	2
campestris)		
некроз сердцевины стебля	040/5414/07557	0
томата (возо. Pseudomonas	240/FAM/Green	2
corrugata)		

Бурая бактериальная гниль (возб. Ralstonia solanacearum)	256/FAM/Green	2
Черная бактериальная пятнистость томатов (еозб. Xanthomonas euvesicatoria, Xanthomonas campestris pv. vesicatoria mun A)	294/FAM/Green	2
Септориоз злаков (возб. Stagonospora (Septoria) nodorum)	250/FAM/Green	2
Септориоз злаков (возб. Septoria tritici)	250/FAM/Green	2
Угловатая пятнистость листьев (возб. Pseudomonas syringae pv. Lacrimans, ранее Pseudomonas lacrimans)	162/FAM/Green	3
Фомопсис подсолнечника (возб. Diaporthe helianthi)	331/FAM/Green	2
Гниль сахарной свёклы – (возб. Pseudomonas syringae)	170/FAM/Green	2
<i>F. graminearum, F. culmorum</i> — токсины DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, FUSX, ZEA	410/FAM/Green	2
<i>F. sporotrichiodes, F. langsethiae</i> — токсины T-2, HT-2, DAS, NEO, ZEA	333/FAM/Green	2
<i>F. роае</i> — токсины NIV, FUSX, T-2, HT- 2, DAS, ZEA	188/FAM/Green	2
<i>F. avenaceum, F. tricinctum</i> — токсины MON, BEA, ENN	289/FAM/Green	2
Вертициллёз хмеля (возб. Verticillium albo-atrum)	138/FAM/Green	4
Тифулёз хмеля (возб. Typhula idahoensis)	155/FAM/Green	4
Тифулёз хмеля (возб. Typhula ishikariensis)	116/FAM/Green	4
<b>Мучнистая роса хмеля</b> (возб. Podosphaera macularis)	188/FAM/Green	4
Чёрная ножка картофеля (возб. Pectobacterium parmentieri)	218/FAM/Green	4
Ложная мучнистая роса хмеля (возб. Pseudoperonospora humuli)	223/FAM/Green	4
Ризоктониоз хмеля (возб. Helicobasidium purpureum)	117/FAM/Green	4
Внутренний контроль (тест-системы на FLASH/форез)	560/HEX/Yellow	

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 c	
60°C	5 c	50
64°C*	45 c*	
10°C	Хранение	

\*- регистрация результатов

Таблица 3. Формат «Real Time» Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

Температура	Время	Количество	
Температура		циклов	
94°C	2 мин	1	
94°C	15 c		
60°C	5 c	50	
67°C*	45 c		
10°C	Хранение		

\*- регистрация результатов

# Таблица 4. Формат «Real Time»

Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

Температура	Время	Количество
температура	время	циклов
94°C	5 мин	1
94°C	30 c	
60°C*	30 c	50
72°C	20 c	
10°C	Хранение	

\*- регистрация результатов

Таблица 5 Формат «Real Time»

Режим амплификации для амплификатора Corbett Rotor-Gene 6000

Температура	Browg	Количество
температура	время	циклов
94°C	5 мин	1
94°C	30 c	
55°C*	30 c	50
72°C	20 c	
10°C	Хранение	

\*- регистрация результатов

Edit Profile	
New Open Save As Help	
The run will take approximately 87 minute(s) to complete. The	he graph below represents the run to be performed
Click on a cycle below to modify it	
Cycling Cycling 2	Insertation
	Insert before
	Remove
This cycle repeats 50 time(s).	a add and company stone for this could
Timed Step	
62 deg. 94 deg. for 10 sect	s
25 seconds	
Acquiring to Cycling B	
on Green	62 deg. for 25 secs
Long Range     Touchdown	58\teg for 5 sacs
	QK

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».

redenser	ion		
ame as	Previous	(New Ac	cquisition)
Annulai	Rea Cont	an a	
Acquis	tion Conti	guration :	Acquiring Chample :
Name	ne chann	D10 .	Name .
Crime	20		
HBM			<    Sheen
Orang	Ð		
Red			
Yellow	4		
To acq channe	uire from a L select it	a channel, in the right	select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a -hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.
To acq channe Dye Ch	uire from a L select it art >>	a channel, in the right lection C	select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a -hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<. 
To acq channe Dye Ch Dye Chu	uire from a L select it art >> annel Se Source	a channel, in the right lection C	select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a -hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<. 
To acq channe Dye Ch Dye Cha Channel Green	art >> annel Se	a channel, in the right lection C Detector 510nm	select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a -hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<. <u>OK</u> Don't Acquire Help hart Path <sup>2</sup> , SyBR Green 1 <sup>(1)</sup> , Fluorescein, EvsGreen <sup>(1)</sup> , Alexa Fluor 485 <sup>(1)</sup>
To acq channe Dye Ch Dye Channel Channel Channel Yellow	art >> annel Se 470nm 530nm	e channel, in the right lection C Detector 510nm 555nm	select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a -hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<. <u>OK</u> Don't Acquire Help hart Patrix FAM <sup>(2)</sup> , SYBR Green 1 <sup>(1)</sup> , Fluorescein, EveOreen <sup>(2)</sup> , Alexa Fluor 485 <sup>(2)</sup> JOE <sup>(2)</sup> , VIC <sup>(2)</sup> , HEX, TET <sup>(2)</sup> , CAL, Fluor Gold 540 <sup>(2)</sup> , Yakima Yellow <sup>(2)</sup>
To acq channe Dye Ch Oye Channel Channel Channel Vellow Drange	uire from a l, select it annel Se Source 470nm 530nm 585nm	lection C Detector 510nm 550nm 510nm	select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<. <table>          QK         Don't Acquire         Help           bart         Press         FAM<sup>(0)</sup>, SYBR Green 1<sup>(1)</sup>, Fluorescein, EvaGreen <sup>(1)</sup>, Alexa Fluor 485<sup>(1)</sup>         Job<sup>(1)</sup>, VIC<sup>(2)</sup>, HEX, TET<sup>(2)</sup>, CAL, Fluor Gold 540<sup>(1)</sup>, Yasima Yellow<sup>(1)</sup>           ROX<sup>(1)</sup>, CAL, Fluor Red 610<sup>(2)</sup>, Cy3.5<sup>(1)</sup>, Taxas Red<sup>(1)</sup>, Alexa Fluor 563<sup>(1)</sup>         Rox<sup>(1)</sup>, CAL, Fluor Red 610<sup>(2)</sup>, Cy3.5<sup>(1)</sup>, Taxas Red<sup>(2)</sup>, Alexa Fluor 563<sup>(1)</sup></table>
To acq channe Dye Ch Dye Chu Channel Channel Channel Oren Drange	art >> ar	a channel, in the right Ection C Detector 510nm 555nm 510nm 655nm 610nm	select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a thand list and click <. To remove all acquisitions, click <<. <table>          QK         Don't Acquire         Help           back         FAM.<sup>0</sup>, SVBR Green 1<sup>th</sup>, Fluorescein, EvaGreen <sup>10</sup>, Alexa Fluor 485.<sup>10</sup>         JOE<sup>10</sup>, VIG<sup>10</sup>, HEX, TET<sup>10</sup>, CAL Fluor Gold 540<sup>10</sup>, Yaxima Yellow<sup>10</sup>           ROX<sup>10</sup>, CAL Fluor Red 610<sup>10</sup>, Cy3.5<sup>10</sup>, Texas Red <sup>10</sup>, Alexa Fluor 568.<sup>10</sup>         Cy6<sup>10</sup>, Quasar 670<sup>10</sup>, Alexa Fluor 633.<sup>10</sup></table>
To acq channel Dye Chi Oye Chi Channel Disen Orange In Crimiton	art >> Source 470nm 530nm 530nm 525nm 680nm	e channel, in the right Ection C Detector 510nm 555nm 555nm 560nm 710hp	select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a thand list and click <. To remove all acquisitions, click <<. <table>          QK         Don't Acquire         Help           hart           PAM<sup>®</sup>, SYBR Green 1<sup>th</sup>, Fluorescein, EveGreen<sup>10</sup>, Alexa Fluor 485<sup>th</sup>           Add to 1<sup>th</sup>, Fluorescein, EveGreen<sup>10</sup>, Alexa Fluor 485<sup>th</sup>           Add to 1<sup>th</sup>, CAL, Fluor Cold 540<sup>th</sup>, Yasima Yellow<sup>10</sup>           ROX<sup>(1)</sup>, CAL, Fluor Gold 540<sup>th</sup>, Yasima Yellow<sup>10</sup>           Cop<sup>60</sup>, Clauser BTO<sup>10</sup>, Alexa ETULOr 508<sup>th</sup>           Cop<sup>60</sup>, Clauser BTO<sup>10</sup>, Alexa ETULOr 508<sup>th</sup>           Quasar705<sup>th</sup>, Alexa Fluor 600<sup>th</sup></table>

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

emperatu	re Profile :					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
Edit Profi	  e]					combo box to display help about its available settings
Channel Se	tup :	Detector	Gain		raata New	
Channel Se Name Green	etup : Source 470nm	Detector 510nm	Gain 5	O	reate <u>N</u> ew	
hannel Se Name Green Yellow	etup : Source 470nm 530nm	Detector 510nm 555nm	Gain 5 5	C	reate <u>N</u> ew	
Name Name Green Yellow Orange	Source 470nm 530nm 585nm	Detector 510nm 555nm 610nm	Gain 5 5 5	C;	Edit	
hannel Se Name Green Yellow Orange Red Crimson	tup : Source 470nm 530nm 585nm 625nm 680nm	Detector 510nm 555nm 610nm 660nm 710hp	Gain 5 5 5 5 7 7		reate <u>N</u> ew <u>E</u> dit Edit <u>G</u> ain Bemove	
hannel Se Name Green Yellow Orange Red Crimson HRM	2007 2007 2007 2007 2007 2007 2007 2007	Detector 510nm 555nm 610nm 660nm 710hp 510nn	Gain 5 5 5 5 7 7 7	E Re	Edit Edit Edit Gain Bemove eset Defaults	

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».

Auto-Gain Optimisation Setup	8
Optimisation :	
Auto-Gain Optimisation will read the fluoresence on the inserted sample at different gain levels until it finds one at which the fluorescence levels are acceptable. The range of fluorescence you are looking for depends on the chemistry you are performing.	
Set temperature to 60 degrees.	
Optimise All Optimise Acquiring	
🔽 Perform Optimisation Before 1st Acquisition	
Perform Optimisation At 60 Degrees At Beginning Of Run	
Channel Settings :	
Auto-Gain Optimisation Channel Settings	Add
Channel Settings :	<u>E</u> dit
Channel : Green 🛛 Tube Position : 🧵 🛨	<u>R</u> emove
Target Sample Range F ÷ FI up to 10 ÷ FI.	Remove All
Acceptable Gain Range: 10 🛨 to 10 🛨	
OK Cancel Help	
4 III +	
Start Manual Close Help	

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 амплифи- катора 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.

Giv	en Cor	ic. Format : 123457		•	Unit : copies/ml 💌	More Opti	ons (
Sar	nples :						
Sta	andard		/		- C ધ 🖬 🕒	1 3	I
С	ID	Name	Type	Groups	Given Conc.	Selected	1-1
	1	Ct1	Standard		1000000	Yes	
	2	Cr1	Standard		1000000	Yes	
	3	Cr1	Standard		1000000	Yes	
	4	Ct2	Standard		3000	Yes	
	5	Cr2	Standard		3000	Yes	
	6	Ct2	Standard		3000	Yes	
	7	K+	Unknown			Yes	
	8	K+	Unknown			Yes	
	9	K+	Unknown			Yes	
	10	K+	Unknown			Yes	
	11	K-	Unknown			Yes	
	12	K-	Unknown			Yes	-

#### 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».



меню«Ignore First» установить «5».

В меню «Quant. Removal» установить значение NTC threshold 5%.



В

Активировать окно «Cycling A Green». Установить Threshold для всех каналов 0,04. Активировать окно «Cycling A Yellow». Установить Threshold для всех каналов 0,04.

<b>CT</b> Calculation	1	- 5/
Invert Raw D	ata	1
Ihreshold :	0.04	
Eliminate Cycles before :	1	-

В таблице «Quant. Results» появятся значения Сt для каждого образца.

# **III. Интерпретация результатов**

Учет результатов реакции с помощью детектирующего амплификатора.

- Для биологических образцов, содержащих ДНК фитопатогена, программа фиксирует<sup>\*</sup> 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 Сt в канале FAM/Green). При этом программа фиксирует значение Ct для внутреннего контроля (канал HEX/Yellow).
- В случае отсутствия значений Сt 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).