АгроДиагностика

117587, город Москва,
Варшавское ш,
д. 125ж к.6, этаж 3 помещ. 5
Тел.: +7 (495) 727-60-71
web: www.agrodiagnostica.com
e-mail: agrodiagnostica@bk.ru

Краткая инструкция к комплектам реагентов для проведения ПЦР-амплификации ДНК фитопатогенов (формат«Real-Time»)

Состав (на 50 определений)

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

*** - для формата «Real-Time» пробирки могут быть заменены 6 стрипами по 8пробирок. В этом случае общее число определений составляет 48.**

****- в комплекте реагентов для FLASH.**

Инструкция по применению

I. 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-»).

Примечание. *Пробирки для формата «Real-Time» нельзя подписывать на крышечке*.

2. При использовании для учета результатов амплификации ПЦР-детектора (формат «Flash») промаркируйте дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фоновой флуоресценции.
3. 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.
4. Добавьте в каждую пробирку по 20 мкл минерального масла, плотно закройте пробирки.
5. Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.
6. 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.
7. Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
8. 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

1. Формат «Форез»: результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (см. табл.2-3 и инструкцию для проведения гель-электрофореза).
2. Формат «Flash»: с помощью ПЦР-детектора «Джин» согласно инструкции к прибору или с помощью гель-электрофореза. (см. табл.2-3 и инструкцию для проведения гель-электрофореза). Пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10; для внутреннего контроля-2,50).
3. Формат «Real-time»: на приборах ДТ-322/ДТ96/ДТпрайм/ДТлайт («ДНК- Технология») в соответствии с инструкциями к приборам.

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

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пн/ канал детекции	Программа амплификации
		ДТ-96/ДТ-322/ ДТпрайм/ДТлайт
Возбудитель рака картофеля (Synchytrium endobioticum). Внимание! Результат считается положительным только при Cq<30.	110/FAM	4
Внутренний контроль (тест-системы на FLASH/форез)	560/HEX	-