**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a bacteriei  *XYLOPHILUS AMPELINUS***

**prin real-time PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | ***XYLOPHILUS AMPELINUS***  (XANTAM) |
| Metodă /  Referință: | **Real-time PCR (TaqMan)**  **OEPP - PM 7/96 (1) –** Dreo et al., 2 007 |
| Matrice: | **Material vegetal (frunze, tulpini), butasi, cultura pura– vita de vie** |
| Țintă: | **Xamp 1.27A, 16S rDNA** (Manceau et al., 2000) |
| Oligonucleotide: | **Xamp 14F** CCC GAT GAT AAA TAC CGA AAA CTC  **Xamp 104R** TGT CTT CTG GTT GTT TTG GTT TTA AT  **Xamp 14F/104 MGB Probe** FAM - AGC GCC TGA CGC AT - MGB  secvente 5’-3’ |
| Marime amplicon | **91** perechi baze |
| Master mix: | **TaqMan Universal Master Mix (Roche)** |
| Compoziție mix  Reactivi: | Probele se lucrează atât în forma brută, cât și în diluție (1/10)   |  |  | | --- | --- | | **Reactiv** | **Cf/reactivi volum/rxn** | | **AU** | până la 10 µL | | **2× TaqMan Master Mix (Roche)** | 1x 5 | | Primer **Xamp 14F** | 900 nM | | Primer **Xamp 104R** | 900 nM | | sonda **Xamp 14F/104** | 250 nM | | Volum mix | * 8 | | Volum ADN | * 2 | | Volum total | * 10 | |  |  |   Inlocuirea reactivilor / concentratiilor utilizati, comporta ajustarea corespunzatoare a mixului,  conform PO BM 3 |
| Parametrii și condiții de amplificare: | |  |  |  | | --- | --- | --- | | temperatură | durată | Nr. cicluri | | 50°C | 2 min. | 1 ciclu | | 95°C | 10 min. | 1 ciclu | | 95°C | 15 sec. | 40 cicluri | | 60°C | 1 min. | |
| Sensibilitate  Limită detecție | Cq ˂ 40 (proba nediluata) conform OEPP- PM 7/96 (1) |

A6 PO BM 8 Vers.1/rev.0/03.2021. pag1/1