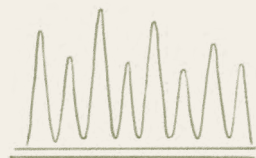
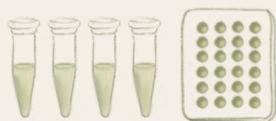
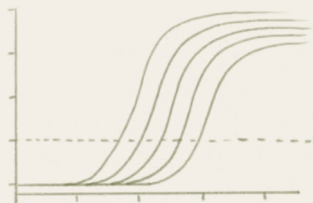


ДИАГНОСТИКА ФИТОПАТОГЕНОВ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ



Содержание

Справочная информация	2
Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов, часть 1	
Наборы реагентов для выделения НК	12
Схемы проведения предварительной подготовки и выделения НК из растительного материала	14
Протоколы наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала	16
Сорб-ГМО-Б	16
ЦитоСорб / CytoSorb	18
ДНК-Экстран-2	20
ДНК-Экстран-3	21
ФитоСорб	22
ФитоСорб-Автомат-48	24
ФитоСорб-П	26
Фитоскрин-Экспресс	28
Фитоскрин-Экспресс	30
Фитоскрин-Экспресс-П	30
Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов, часть 2	
Наборы реагентов для ПЦР в реальном времени	32
Справочная информация	32
Оборудование и материалы	36
Проведение анализа	38
Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ	42
Интерпретация результатов	59
Возможные проблемы и решения	64
Проведение внутрилабораторной валидации наборов (тест-систем)	66
Рекомендации по взятию смывов	70
Пример диагностики растительного материала на наличие нуклеиновых кислот фитопатогенов	72
Примеры результатов ОТ-ПЦР-РВ/ПЦР-РВ анализа на приборах разных производителей	73
Приложение А:	
Наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот	79
Наборы реагентов для выявления фитопатогенов	80
Список сокращений	85
Для замечок	86

Справочная информация

А. Протоколы выявления и дифференциальной диагностики возбудителей болезней растений методом ПЦР в реальном времени по следующим возбудителям:

1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, кольцевая гниль картофеля

- PM 7/59 (2) *Clavibacter sepedonicus* EPPO Bulletin. 2022; 52: 262–285.
- PM 8/1 (2) Potato. EPPO Bulletin. 2017; 47: 487–503.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 64–2016 МР ВНИИКР

2. *Ralstonia solanacearum* (паса 3, bv.2) и *Ralstonia solanacearum* (паса 1, bv.1), бурая гниль картофеля

- PM 7/21 (3) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex) EPPO Bulletin. 2022; 52: 225–261.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- СТО ВНИИКР 4.009–2013

3. *Candidatus Liberibacter solanacearum*, «зебра чип»

- PM 7/143 (1) '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' EPPO Bulletin. 2020; 50: 49–68.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- ГОСТ 32592–2013 Семена овощных, бахчевых культур, кормовых корнеплодов и кормовой капусты. Сортные и посевные качества. Общие технические условия.
- 59–2019 МР ВНИИКР

4. Род бактерий *Dickeya*, черная ножка и мягкая гниль картофеля

- PM 8/1 (2) Potato. EPPO Bulletin. 2017; 47: 487–503.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.

5. *Candidatus Phytoplasma solani*, столбур картофеля и почернение древесины винограда

- ГОСТ Р 53050–2008 Материал для размножения винограда (черенки, побеги). Технические условия.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.

6. *Dickeya solani* и *D. dianthicola*, черная ножка картофеля

- PM 8/1 (2) Potato. EPPO Bulletin. 2017; 47: 487–503.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.

7. Род *Pectobacterium*, черная ножка и мягкая гниль картофеля

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.

8. *Pectobacterium wasabiae* и *P. atrosepticum*, черная ножка и мягкая гниль картофеля

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.

9. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* и *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, черная ножка картофеля

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.

10. *Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis*, бледная и золотистая картофельная нематода

- PM 7/40 (5) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. EPPO Bulletin. 2022; 52: 286–313.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 51–2022 МР ВНИИКР

11. *Synchytrium endobioticum*, рак картофеля

- PM 7/28 (2) *Synchytrium endobioticum*. EPPO Bulletin. 2017; 47: 420–440.
- PM 3/98 (1) Inspection of growing media associated with consignments of plants for planting. EPPO Bulletin. 2024; 54: 289–305.
- PM 9/5 (2) *Synchytrium endobioticum*. 2017; 47: 511–512.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 48–2014 МР ВНИИКР

12. *Acidovorax citrulli*, бактериальная пятнистость тыквенных культур

- PM 7/127 (1) *Acidovorax citrulli*. EPPO Bulletin. 2016; 46: 444–462.
- 67–2015 МР ВНИИКР

13. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактериальный рак томата

- PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO Bulletin. 2016; 46: 202–225.
- 53–2022 МР ВНИИКР

14. *Xylophilus ampelinus*, бактериальное увядание винограда

- PM 7/96 (1) *Xylophilus ampelinus*. EPPO Bulletin. 2009; 39: 403–412.
- ГОСТ 31783–2012 Посадочный материал винограда (саженцы). Технические условия.
- ГОСТ Р 53050–2008 Материал для размножения винограда (черенки, побеги). Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 69–2014 МР ВНИИКР

15. *Xylella fastidiosa*, бактериоз винограда, болезнь Пирса

- PM 7/24 (5) *Xylella fastidiosa*, EPPO Bulletin. 2023; 53: 205–276.
- ГОСТ 31783–2012 Посадочный материал винограда (саженцы). Технические условия.
- ГОСТ Р 53050–2008 Материал для размножения винограда (черенки, побеги). Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 74–2021 МР ВНИИКР

16. *Candidatus Phytoplasma vitis*, золотистое пожелтение винограда

- PM 7/079 (2) Grapevine flavescence doree phytoplasma. EPPO Bulletin. 2016; 46: 78–93.
- ГОСТ 31783–2012 Посадочный материал винограда (саженцы). Технические условия.
- ГОСТ Р 53050–2008 Материал для размножения винограда (черенки, побеги). Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 60–2014 МР ВНИИКР

17. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, бактериальный вилт кукурузы

- PM 7/60 (2) *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. EPPO Bulletin. 2016; 46: 226–236.
- ГОСТ 35245–2025 Кукуруза. Технические условия.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- 100–2021 МР ВНИИКР

18. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, бактериальный ожог риса

- PM 7/80 (1) *Xanthomonas oryzae*. EPPO Bulletin. 2007; 37: 543–553.
- ГОСТ ISO 7301–2013 Рис. Технические условия.
- ГОСТ Р 55289–2012 Рис. Технические условия.
- 49–2014 МР ВНИИКР

19. *Cercospora kikuchii*, пурпурный церкоспороз сои

- ГОСТ 17109–88 Соя. Требования при заготовках и поставках.
- ГОСТ 13586.3–2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- 96–2017 МР ВНИИКР

20. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, ржаво-бурая пятнистость листьев фасоли (сой)

- РМ 7/102 (1) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. EPPO Bulletin. 2011; 41: 320–328.
- ГОСТ 13586.3–2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.

21. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, бактериальная полосатость риса

- РМ 7/80 (1) *Xanthomonas oryzae*. EPPO Bulletin. 2007; 37: 543–553.
- ГОСТ ISO 7301–2013 Рис. Технические условия.
- ГОСТ Р 55289–2012 Рис. Технические условия.
- 49–2014 МР ВНИИКР

22. *Diaporthe helianthi*, фомопсис подсолнечника

- ГОСТ 22391–2015 Подсолнечник. Технические условия.
- ГОСТ 10852–86 Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 29141–91 Семена масличных культур. Выделение пробы для анализа из средней пробы.
- ГОСТ 29142–91 Семена масличных культур. Отбор проб.
- 67–2021 МР ВНИИКР

23. *Candidatus Phytoplasma mali*, пролиферация яблони

- РМ 7/62 (3) '*Candidatus Phytoplasma mali*'; '*Ca. P. pyri*' and '*Ca. P. prunorum*'. EPPO Bulletin. 2020; 50: 69–85.
- МСФМ 27 Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. ДП 12: Фитоплазмы. 2016 г.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- ГОСТ Р 70191–2022 Материал посадочный субтропических, орехоплодных, цитрусовых культур и чая. Технические условия.
- 12–2015 МР ВНИИКР

24. *Candidatus Phytoplasma pyri*, истощение груши

- РМ 7/62 (3) '*Candidatus Phytoplasma mali*'; '*Ca. P. pyri*' and '*Ca. P. prunorum*'. EPPO Bulletin. 2020; 50: 69–85.
- МСФМ 27 Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. ДП 12: Фитоплазмы. 2016 г.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- ГОСТ Р 70191–2022 Материал посадочный субтропических, орехоплодных, цитрусовых культур и чая. Технические условия.
- 98–2016 МР ВНИИКР

25. Представители рода *Monilinia*, монилиозные гнили плодовых

- РМ 7/18 (3) *Monilinia fructicola*. EPPO Bulletin. 2020; 50: 5–18.
- 73–2015 МР ВНИИКР

26. *Erwinia amylovora*, ожог плодовых

- РМ 7/20 (3) *Erwinia amylovora*. EPPO Bulletin. 2022; 52: 198–224.
- СТО ВНИИКР 4.001–2010
- 146–2018 МР ВНИИКР

27. Представители *Colletotrichum acutatum* complex

- РМ 3/83 (1) *Fragaria* plants for planting – inspection of places of production. EPPO Bulletin. 2017; 38: 396–406.
- МСФМ 31 Методики отбора образцов от грузов. 2008 г.
- МР ВНИИКР 25.015–2025

28. *Bursaphelenchus xylophilus*, сосновая стволовая нематода

- PM 7/44 (4) *Bursaphelenchus xylophilus*. EPPO Bulletin. 2023; 53: 156–183.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- СТО ВНИИКР 6.003–2020
- 50–2021 МР ВНИИКР

29. Tomato yellow leaf curl disease, вирус желтой курчавости листьев томата

- PM 7/152 (1) Begomoviruses. EPPO Bulletin. 2022; 52: 643–664.
- ГОСТ 34298–2017 Томаты свежие. Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 39–2015 МР ВНИИКР

30. *Phytophthora ramorum*, фитофтороз древесных и кустарниковых культур

- PM 7/66 (1) *Phytophthora ramorum*. EPPO Bulletin. 2006; 36: 145–155.
- 18–2021 МР ВНИИКР

31. *Tilletia controversa*, карликовая головня пшеницы

- PM 3/78 (2) Consignment inspection of seed and grain of cereals. EPPO Bulletin. 2021; 51: 387–396.
- ГОСТ 9353–2016 Пшеница. Технические условия.
- МР ВНИИКР 25.001–2025

32. *Tilletia indica*, индийская головня пшеницы

- PM 7/29 (3) *Tilletia indica*. EPPO Bulletin. 2018; 48: 7–31.
- ГОСТ 9353–2016 Пшеница. Технические условия.
- МР ВНИИКР 25.001–2025

33. *Rathayibacter tritici*, желтый слизистый бактериоз пшеницы

- ГОСТ 9353–2016 Пшеница. Технические условия.
- 30–2023 МР ВНИИКР

34. *Ceratocystis fagacearum*, сосудистый микоз дуба

- PM 7/1 (2) *Bretziella fagacearum* (formerly *Ceratocystis fagacearum*). EPPO Bulletin. 2023; 53: 505–517.
- 52–2022 МР ВНИИКР

35. *Puccinia horiana*, белая ржавчина хризантем

- PM 7/027 (2) *Puccinia horiana*. EPPO Bulletin. 2020; 50: 207–216.
- СТО ВНИИКР 3.013–2024

36. *Heterodera glycines*, соевая цистообразующая нематода

- PM 7/89 (2) *Heterodera glycines*. EPPO Bulletin. 2018; 48: 64–77.
- PM 7/119 (1) Nematode extraction. EPPO Bulletin. 2013; 43: 471–495.
- ГОСТ 17109–88 Соя. Требования при заготовках и поставках.
- 32–2015 МР ВНИИКР

37. *Stenocarpella maydis*, диплоидиоз кукурузы

- PM 3/78 (2) Consignment inspection of seed and grain of cereals. EPPO Bulletin. 2021; 51: 387–396.
- ГОСТ 35245–2025 Кукуруза. Технические условия.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- 46–2023 МР ВНИИКР

38. *Bipolaris zeicola*, пятнистость листьев кукурузы

- PM 3/78 (2) Consignment inspection of seed and grain of cereals. EPPO Bulletin. 2021; 51: 387–396.
- ГОСТ 35245–2025 Кукуруза. Технические условия.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- 136–2017 МР ВНИИКР

39. *Diaporthe vaccinii*, вязкая гниль черники

- PM 7/086 (1) *Diaporthe vaccinii*. EPPO Bulletin. 2009; 39: 18–24.
- 52–2023 МР ВНИИКР

40. *Burkholderia caryophylli*, бактериальный вилт гвоздики

- PM 7/058 (1) *Burkholderia caryophylli*. EPPO Bulletin. 2006; 36: 95–98.
- ГОСТ 28852–90 Рассада цветочных культур. Технические условия.
- МР ВНИИКР 24.004–2024

41. *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, черный бактериоз зерновых культур

- PM 3/78 (2) Consignment inspection of seed and grain of cereals. EPPO Bulletin. 2021; 51: 387–396.
- ГОСТ 13586.3–2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.
- 29–2023 МР ВНИИКР

42. *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, угловая пятнистость фасоли

- ГОСТ 17109–88 Соя. Требования при заготовках и поставках.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- 38–2019 МР ВНИИКР

43. *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*, бактериальный ожог фасоли

- ГОСТ 17109–88 Соя. Требования при заготовках и поставках.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.

44. *Leptosphaeria maculans*, фомоз рапса

- ГОСТ 10852–86 Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 29141–91 Семена масличных культур. Выделение пробы для анализа из средней пробы.
- 32–2023 МР ВНИИКР

45. *Clavibacter nebraskensis*, вилт Госсса

- ГОСТ 35245–2025 Кукуруза. Технические условия.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- 48–2019 МР ВНИИКР

46. *Diaporthe caulivora*, рак стеблей сои

- ГОСТ 10852–86 Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 17109–88 Соя. Требования при заготовках и поставках.
- 50–2019 МР ВНИИКР

47. *Phytophthora infestans*, фитофтороз картофеля

- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.

48. *Lecanosticta acicola*, коричневый пятнистый ожог хвои сосны

- PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini*. EPPO Bulletin. 2015; 45: 163–182.
- 49–2023 МР ВНИИКР

49. *Hymenoscyphus fraxineus*, суховершинность ясеня

- PM 7/117 (1) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. EPPO Bulletin. 2013; 43: 449–461.
- 133–2017 МР ВНИИКР

50. *Stagonosporopsis andigena* (syn. *Phoma andigena*), фомозная пятнистость листьев картофеля

- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- 48–2021 МР ВНИИКР

51. *Stagonosporopsis chrysanthemi* (syn. *Didymella ligulicola*), аскохитоз хризантем

- PM 7/159 (1) *Stagonosporopsis chrysanthemi*. EPPO Bulletin. 2025; 55: 203–210.
- 55–2021 МР ВНИИКР

52. *Ditylenchus destructor*, стеблевая нематода картофеля

- PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. EPPO Bulletin. 2017; 47: 401–419.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- 93–2017 МР ВНИИКР

53. *Pseudomonas fuscovaginae*, бактериальная гниль влагалища пшеницы

- ГОСТ 13586.3–2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.
- 27–2023 МР ВНИИКР

54. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, бактериальный ожог гороха

- EPPO Standard PP 2/1(1) Guideline on good plant protection practice: principles of good plant protection practice. EPPO Bulletin 24. 1994 233–240.
- 60–2022 МР ВНИИКР
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.

55. *Xanthomonas hyacinthi*, желтая болезнь гиацинта

- ГОСТ 28849–90 Луковицы и клубнелуковицы цветочных культур. Технические условия.
- PM 4/23 (2) Production of healthy plants for planting. EPPO Bulletin. 2022; 32: 185–190.
- 59–2022 МР ВНИИКР

56. Род *Candidatus Phytoplasma*

- PM 7/133 (1) Generic detection of phytoplasmas. EPPO Bulletin. 2019; 48: 414–424.
- МСФМ 27 Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. ДП 12: Фитоплазмы. 2016 г.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- ГОСТ Р 70191–2022 Материал посадочный субтропических, орехоплодных, цитрусовых культур и чая. Технические условия.

Б. Протоколы выявления и дифференциальной диагностики вирусных и виroidных возбудителей болезней растений методом ПЦР в реальном времени совмещенной с реакцией обратной транскрипции по следующим возбудителям:

1. Potato Virus X и Potato Virus Y, X и Y вирусы картофеля

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 41–2023 МР ВНИИКР

2. Potato Virus M и Potato Leafroll Virus, M вирус картофеля и вирус скрученности листьев картофеля

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 41–2023 МР ВНИИКР

3. Potato Virus S и Potato Virus A, S и A вирусы картофеля

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 41–2023 МР ВНИИКР

4. Potato spindle tuber viroid, виroid веретенovidности листьев картофеля

- PM 7/138 (1) Pospiviroids (genus *Pospiviroid*). EPPO Bulletin. 2021; 51: 144–177.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.

- 38–2015 МР ВНИИКР

5. Andean potato mottle virus, андийский комовирус крапчатости картофеля

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- СТО ВНИИКР 5.004–2013

6. Andean potato latent virus, андийский латентный вирус картофеля

- PM 7/132 (1) *Andean potato latent virus and Andean potato mildmosaic virus*. EPPO Bulletin. 2018; 48: 405–413.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- СТО ВНИИКР 5.003–2013

7. Potato black ringspot virus, вирус черной кольцевой пятнистости листьев картофеля

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 47–2019 МР ВНИИКР

8. Tomato ringspot virus, вирус кольцевой пятнистости томата

- PM 7/49 (1) *Tomato ringspot nepovirus*. EPPO Bulletin. 2005; 35: 313–318.
- ГОСТ 34298–2017 Томаты свежие. Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 47–2013 МР ВНИИКР

9. Tomato spotted wilt virus, вирус бронзовости (увядания) томата

- ГОСТ 34298–2017 Томаты свежие. Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- PM 7/139 (1) *Tospoviruses (Genus Orthotospovirus)*, EPPO Bulletin. 2020; 50: 217–240.
- 02–2020 МР ВНИИКР

10. Tomato brown rugose fruit virus, вирус коричневой морщинистости плодов томата

- PM 7/146 (2) *Tomato brown rugose fruit virus*. EPPO Bulletin. 2022; 52: 665–692.
- ГОСТ 34298–2017 Томаты свежие. Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 01–2020 МР ВНИИКР

11. Pepino mosaic virus, вирус мозаики пегино

- PM 7/113 (1) *Pepino mosaic virus*. EPPO Bulletin. 2013; 43: 94–104.
- ГОСТ 34298–2017 Томаты свежие. Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 60–2019 МР ВНИИКР (третья редакция, 2025 г.)

12. Tobacco ringspot virus, вирус кольцевой пятнистости табака

- PM 7/2 (2) *Tobacco ringspot virus* EPPO Bulletin. 2017; 47: 135–145.
- ГОСТ Р 55363–2012 (ИСО 4874:2000) Табак. Отбор проб от партий сырья. Основные положения.
- 69–2013 МР ВНИИКР

13. Plum pox potyvirus, вирус шарки (оспы) сливы

- PM 7/32 (2) *Plum pox virus*. EPPO Bulletin. 2023; 53: 518–539.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- ГОСТ 33505–2015 Карантин растений. Методы выявления и идентификации потивируса шарки слив.
- СТО ВНИИКР 5.002–2011

14. Impatiens necrotic spot virus, вирус некротической пятнистости бальзамина

- PM 7/139 (1) *Tospoviruses (Genus Orthotospovirus)*. EPPO Bulletin. 2020; 50: 217–240.
- ГОСТ 28852–90 Рассада цветочных культур. Технические условия.

- 71–2012 МР ВНИИКР

15. Chrysanthemum stunt pospoviroid, вирион карликовости хризантем

- РМ 7/138 (1) Pospiviroids (genus *Pospiviroid*). EPPO Bulletin. 2021; 51: 144–177.
- ГОСТ 18908.2–2019 Цветы срезанные. Хризантемы. Технические условия.
- ГОСТ 28852–90 Рассадка цветочных культур. Технические условия.
- 29–2016 МР ВНИИКР

16. Beet necrotic yellow vein virus, вирус некротического пожелтения жилок сахарной свеклы (ризомания сахарной свеклы)

- РМ 7/30 (3) Beet necrotic yellow vein virus EPPO Bulletin. 2022; 52: 87–97
- ГОСТ 32285–2013 Свекла столовая свежая, реализуемая в розничной торговой сети. Технические условия.
- 44–2023 МР ВНИИКР

17. Peach latent mosaic viroid, вирион латентной мозаики персика

- РМ 4/030 (1) Certification scheme for almond, apricot, peach and plum. EPPO Bulletin. 2001; 31: 463–478.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 53–2015 МР ВНИИКР

18. Potato mop-top virus, вирус метельчатости верхушек картофеля

- РМ 3/21 (3) Post entry quarantine for potato. EPPO Bulletin. 2019; 49: 452–479.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 76–2021 МР ВНИИКР

19. Maize chlorotic mottle virus, вирус хлоротической крапчатости кукурузы

- ГОСТ 35245–2025 Кукуруза. Технические условия.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.

20. Wheat streak mosaic virus, вирус мозаики пшеницы

- ГОСТ 9353–2016 Пшеница. Технические условия.
- ГОСТ 13586.3–2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- МР ВНИИКР 24.011–2024

21. Barley yellow dwarf virus, вирус желтой карликовости ячменя.

- ГОСТ 28672–2019 Ячмень. Технические условия.
- ГОСТ 13586.3–2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.

22. Barley stripe mosaic virus, вирус штриховатой мозаики ячменя

- РМ 3/78 (2) Consignment inspection of seed and grain of cereals. EPPO Bulletin. 2021; 51: 387–396.
- РМ 3/034 (1) Barley stripe mosaic hordeivirus. Inspection and test methods for barley seeds.
- ГОСТ 28672–2019 Ячмень. Технические условия.
- ГОСТ 13586.3–2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- 18–2022 МР ВНИИКР

23. Prunus necrotic ringspot ilarvirus, вирус некротической кольцевой пятнистости косточковых

- ГОСТ 33801–2016 Вишня и черешня свежие. Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- ГОСТ 16524–2017 Кизил свежий. Технические условия.
- ГОСТ 32283–2013 Алыча свежая. Технические условия.
- ГОСТ 21715–2013 Айва свежая. Технические условия.
- ГОСТ 32787–2014 Абрикосы свежие. Технические условия.
- ГОСТ 34340–2017 Персики и нектарины свежие. Технические условия.

24. Prune dwarf ilarvirus, иларвирус карликовости сливы

- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- ГОСТ 21920–2015 Слива свежая для промышленной переработки. Технические условия.

25. Raspberry ringspot virus, вирус кольцевой пятнистости малины

- ГОСТ 33915–2016 Малина и ежевика свежие. Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- 62–2019 МР ВНИИКР

26. Potato yellowing alfamovirus, вирус пожелтения картофеля

- РМ 8/1 (2) Potato. EPPO Bulletin. 2017; 47: 487–503.
- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- 86–2015 МР ВНИИКР

Дополнительная информация:

- ГОСТ 33996–2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.
- ГОСТ Р 59551–2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов.
- ГОСТ 13056.2–89 Семена деревьев и кустарников. Методы определения чистоты.
- ГОСТ 12430–2019 Карантин растений. Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях.
- ГОСТ 33801–2016 Вишня и черешня свежие. Технические условия.
- ГОСТ 28852–90 Рассада цветочных культур. Технические условия.
- ГОСТ 24933.0–81 Семена цветочных культур. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 12036–2025 Семена сельскохозяйственных растений. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 13586.3–2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 12044–93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями.
- ГОСТ Р 54051–2025 Плодовые и ягодные культуры. Стерильные культуры и адаптированные микрорастения. Технические условия.
- ГОСТ 31783–2012 Посадочный материал винограда (саженцы). Технические условия.
- ГОСТ Р 53050–2008 Материал для размножения винограда (черенки, побеги). Технические условия.
- ГОСТ Р 59653–2025 Материал посадочный плодовых и ягодных культур. Технические условия.
- ГОСТ Р 70191–2022 Материал посадочный субтропических, орехоплодных, цитрусовых культур и чая. Технические условия.
- ГОСТ ISO 7301–2013 Рис. Технические условия.
- ГОСТ Р 55289–2012 Рис. Технические условия.
- ГОСТ 22391–2015 Подсолнечник. Технические условия.
- ГОСТ 10852–86 Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб.
- ГОСТ 29141–91 Семена масличных культур. Выделение пробы для анализа из средней пробы.
- ГОСТ 29142–91 Семена масличных культур. Отбор проб.
- ГОСТ 34298–2017 Томаты свежие. Технические условия.
- ГОСТ 9353–2016 Пшеница. Технические условия.
- ГОСТ 35245–2025 Кукуруза. Технические условия.
- ГОСТ Р 55363–2012 (ИСО 4874:2000) Табак. Отбор проб от партий сырья. Основные положения.
- ГОСТ 28852–90 Рассада цветочных культур. Технические условия.
- ГОСТ 18908.2–2019 Цветы срезанные. Хризантемы. Технические условия.

- ГОСТ 32285–2013 Свекла столовая свежая, реализуемая в розничной торговой сети. Технические условия.
- ГОСТ 28672–2019 Ячмень. Технические условия.
- ГОСТ 16524–2017 Кизил свежий. Технические условия.
- ГОСТ 32283–2013 Алыча свежая. Технические условия.
- ГОСТ 21715–2013 Айва свежая. Технические условия.
- ГОСТ 32787–2014 Абрикосы свежие. Технические условия.
- ГОСТ 34340–2017 Персики и нектарины свежие. Технические условия.
- ГОСТ 33915–2016 Малина и ежевика свежие. Технические условия.

Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов, часть 1

Наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот (НК)

Содержит:

- А. Сводные таблицы и схемы по выделению НК
- Б. Протоколы выделения НК фитопатогенов различной природы и из разных типов растительного материала

Набор	Минимальное время выделения 1 образца без пробоподготовки	РНК вирусы / Вироиды из растений	ДНК бактерий из растений	ДНК грибов из растений	ДНК растений	ДНК из чистой культуры (грибы/ бактерии)
ФитоСорб ¹	40 мин	+	+	+	+	+
Сорб-ГМО-Б ²	110 мин	+	+	+	+	+
ЦитоСорб ³	50 мин	+	+	+	-	+
ДНК-экстран-3 ⁴	120 мин	-	+	+	+	+
Фитоскрин-Экспресс ²	36 мин 96 образцов на автоматической станции выделения НК 45 мин 12 образцов ручным способом	+	+	+	+	+

- 1. Только для образцов с низким содержанием вторичных метаболитов (картофель, овощные).
- 2. Подходит для выделения высокобелковых и образцов с высоким содержанием вторичных метаболитов (бобовые, зерновые, виноград, плодово-ягодные).
- 3. Подходит для образцов с высоким содержанием вторичных метаболитов (виноград, плодово-ягодные).
- 4. Подходит для простых в выделении образцов (культуры грибов/бактерий, выделение ДНК из молодых листьев). *Не подходит для выделения РНК вирусов!*

Общая информация для наборов реагентов для выделения НК

Условия транспортирования и хранения анализируемых проб

Транспортировку и хранение образцов для анализа проводят в соответствии с утвержденными протоколами ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов. При использовании набора в качестве исследуемого материала может быть любой растительный материал, предназначенный для анализа фитопатогенов.



Кат. № EW-001

ЦитоСорб/СytoSorb



Кат. № EX-511

ДНК-ЭКСТРАН



Кат. № GM-503

Сорб-ГМО-Б



Кат. № PH-520

ФитоСорб



Кат. № PH-522

ФитоСорб-Автомат-48



Кат. № PH-523

ФитоСорб-П



Кат. № PH-524

Фитоскрин-Экспресс

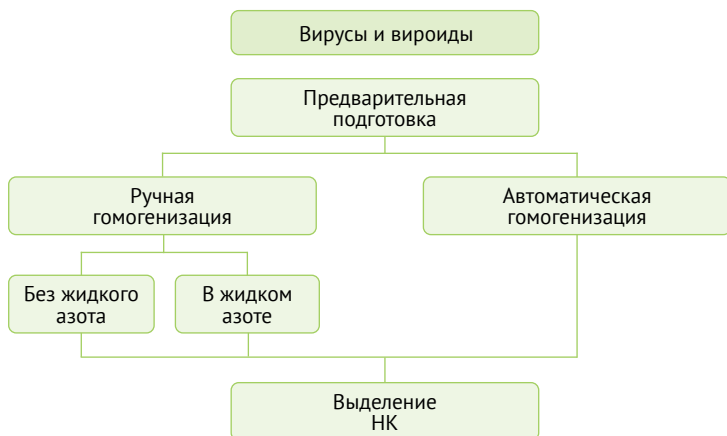


Кат. № PH-526

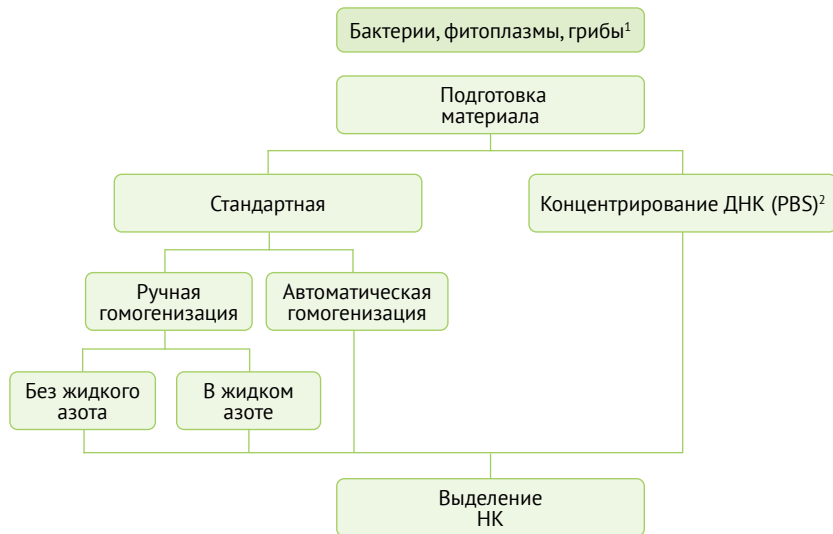
Фитоскрин-Экспресс-П

Схемы проведения предварительной подготовки и выделения НК из растительного материала

Общая схема работы с растительным материалом при выделении нуклеиновых кислот вирусов и вирионов:



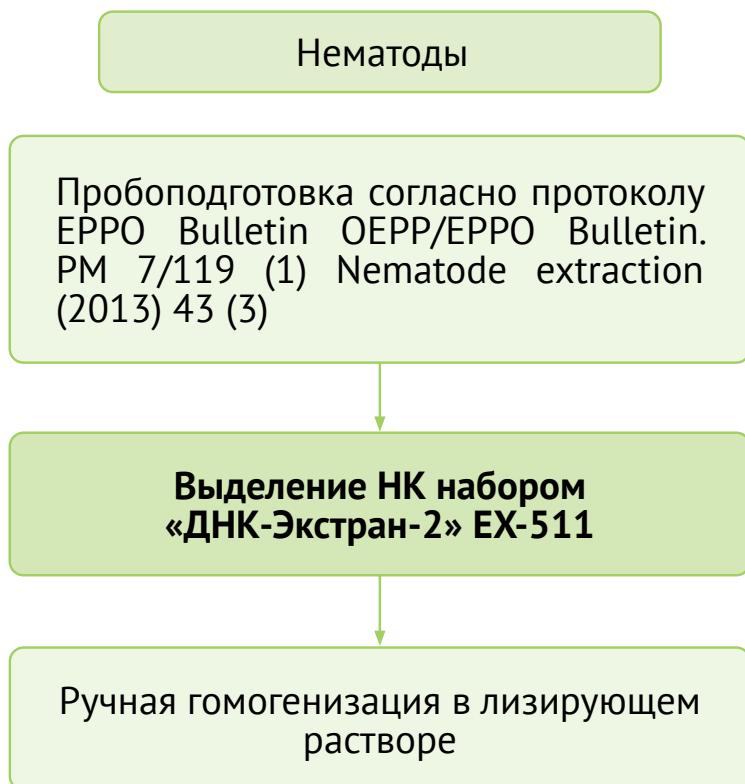
Общая схема работы с растительным материалом при выделении нуклеиновых кислот бактерий, фитоплазм и грибов:



1. Выделение нуклеиновых кислот при фитоплазменной инфекции осуществляется согласно рекомендациям ЕРРО.

2. Метод выделения с обогащением подходит для выделения НК из бессимптомных образцов, см. диагностические протоколы ЕРРО или МФСМ 27. Приложение 13. *Erwinia amylovora* (2016), МККЗР, ФАО.

Общая схема работы при выделении нуклеиновых кислот из нематод



Протоколы наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала

Кат. № GM-503

Сорб-ГМО-Б

Набор реагентов для выделения ДНК из растительного материала, продуктов питания, пищевого сырья растительного и животного происхождения, кормов для животных и семян с использованием ЦТАБ. Рассчитан на 50 выделений при ручной гомогенизации.

Состав набора

- 1

Лизирующий раствор
- 6

Промывочный раствор А
- 2

Протеиназа К
- 7

Промывочный раствор Б
- 3

Экстрагирующий раствор
- 8

Промывочный раствор В
- 4

Осаждающий раствор
- 9

Элюирующий раствор
- 5

Сорбент

Ограничения метода

Выделение растительной и животной ДНК из растительного материала, продуктов питания, пищевого сырья растительного и животного происхождения, кормов для животных и семян затруднено из-за большого разнообразия видов и характера материала, а также особенностей строения клеточной стенки растений.

Перед процедурой выделения нуклеиновых кислот исследуемые образцы должны пройти соответствующую пробоподготовку (измельчение, гомогенизацию, перемешивание) для получения репрезентативного анализируемого образца. При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке материала эффективность выделения ДНК может быть недостаточной и/или привести к ингибированию и/или недостоверным результатам при последующем анализе методом ПЦР (ложноотрицательный результат).

Ложноотрицательный результат ПЦР выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ДНК (или других аналогичных контрольных компонентов, входящих в коммерческие наборы), содержащегося в реакционной ПЦР-смеси.

Для исключения возможной контаминации, возникающей вследствие ошибок персонала лаборатории при работе с набором и приводящей к получению ложноположительного результата при последующем анализе методом ПЦР-РВ, используются отрицательные контрольные образцы выделения.

Анализируемые пробы	Рекомендуемая навеска в соответствии с типом образца
Сухие однородные образцы	50-100 мг
Сухие неоднородные образцы, образцы сложного состава*	50-200 мг
Влажные образцы	50-200 мг
Жидкие образцы	100-300 мкл

**Чем более неоднородный образец, тем большая навеска необходима.*

Предварительная подготовка биологического материала

Перед процедурой выделения нуклеиновых кислот с помощью набора реагентов «Сорб-ГМО-Б» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) для получения репрезентативного анализируемого образца. В качестве буфера для гомогенизации следует использовать реактив № 1 «Лизирующий раствор».

Гомогенизация необходима для повышения однородности пробы и увеличения выхода НК. При этом допускается как ручная гомогенизация, так и автоматическая с использованием гомогенизаторов, шаровых и ножевых мельниц и т. п.

Проведение анализа

Дальнейшее проведение анализа, этапы *Лизис*, *Экстракция*, *Сорбция* и *осаждение*, *Промывка*, *Элюция* выполняются согласно инструкции к набору **GM-503 «Сорб-ГМО-Б»**.

Возможные трудности при выделении НК

При выделении нуклеиновых кислот набором реагентов «Сорб-ГМО-Б» возможны следующие ошибки оператора:

1. На этапе отбора водной фазы образца после лизиса с не осевшими частицами (должна отбираться только жидкая фракция);
2. На этапе отбора водной фазы образца после экстракции хлороформом: после центрифугирования верхнюю водную фазу перенести в подготовленные пробирки из каждой пробирки с образцами в объеме 300 мкл (при недостатке объема верхней водной фазы можно отбирать меньше – до 100 мкл) очень аккуратно, не захватывая нижний органический слой, межфазный слой и неосевшие частицы.
3. Случайное удаление части сорбента на этапах промывки при удалении надосадочной жидкости;
4. На этапе сушки образца перед этапом элюции возможно «недосушивание» или «пересушивание» сорбента;
5. Перенос сорбента в аналитический образец на этапе элюции. В данной ситуации рекомендуется повторить три заключительных пункта этапа *Элюция* (центрифугирование и повторный перенос надосадочной жидкости в чистые пробирки). Наличие сорбента в чистом растворе НК уменьшает качество и срок хранения раствора, а также ингибирует биохимические реакции.

ЦитоСорб / CytoSorb

Набор реагентов для выделения ДНК фитоплазм из растительного материала. Рассчитан на 50 выделений при ручной гомогенизации.

Состав набора

- | | |
|------------------------|-----------------------------------|
| 1 Экстрагирующий буфер | 6 Промывочный раствор 1 |
| 2 Лизирующий раствор | 7 Промывочный раствор 2 |
| 3 Осаждающий буфер | 8 Элюирующий буфер |
| 4 Сорбирующий раствор | 9 Микроцентрифужные пробирки 2 мл |
| 5 Осаждающий раствор | |

Описание набора

Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» предназначен для выделения внутриклеточной ДНК различных видов фитоплазм из растительного материала. Может быть использован для выделения межклеточных (капиллярных) НК из растительного материала – вирусов, вириодов, бактериальных инфекций растений и др.

Пригоден для работы со сложными растительными образцами (виноград, земляника и др.) с большим количеством ингибиторов (полифенолов, полисахаридов и др.). Для предварительной подготовки образца перед выделением НК подходят все части растения – лист, корень, стебель и т. д.

НЕ предназначен для получения ДНК ядерного/полного генома растений!

Ограничения метода

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке биологического материала эффективность выделения НК может быть недостаточной и/или привести к ингибированию при последующем анализе методом ПЦР (ложноотрицательный результат). Ложноотрицательный результат ПЦР выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ДНК (или других аналогичных контрольных компонентов, входящих в коммерческие наборы), содержащегося в реакционной ПЦР-смеси.

Для исключения возможной контаминации, возникающей вследствие ошибок персонала лаборатории при работе с набором и приводящей к получению ложноположительного результата при последующем анализе методом ПЦР-РВ, используются отрицательные контрольные образцы выделения.

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг		Количество водного гомогенного образца для выделения НК, мкл
	Гомогенизация с использованием гомогенизатора	Ручная гомогенизация	
Фитоплазменная инфекция	200–250	400–750	200
Бактериальная инфекция	200–250	400–750	200
Грибная инфекция	200–250	400–750	200
Вирусная/виroidная инфекция	20–100	400–750	200

¹ В случае выделения из сухих частей растения количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза.

² При одновременном исследовании нескольких целевых объектов (например, бактериальная инфекция и вирусная инфекция) следует брать навеску 200–250/400–750 мг.

Предварительная подготовка биологического материала

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Анализируемые пробы») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в стерильную ступку 1 мл экстрагирующего буфера.
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы.
4. Добавить еще 2 мл экстрагирующего буфера в ступку с гомогенным образцом и повторно растереть образцы.
5. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
6. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
7. Центрифугировать 5000 об/мин 5 минут.

Проведение анализа

Дальнейшее проведение анализа, этапы *Лизис, Экстракция, Сорбция и осаждение, Промывка, Элюция* выполняются согласно инструкции к набору **EW-001 «ЦитоСорб/ CytoSorb»**.

Возможные трудности при выделении НК

Проблема	Рекомендация
Ингибирование ПЦР	Убедитесь, что не превышаете указанное количество образца. Убедитесь, что используете прописанное количество элюирующего буфера, занижение количества с целью повышения концентрации ДНК/РНК может привести к ингибированию ПЦР. Убедитесь, что используете в реакции ПЦР указанное производителем количество раствора ДНК/РНК. Убедитесь, что на последнем этапе чистый раствор ДНК/РНК был перенесен в чистую пробирку без захвата сорбента. Перед внесением образца в реакцию рекомендуем провести дополнительное центрифугирование.
Низкая чистота образцов по A260/A230	В связи с использованием реагентов по типу хаотропов и неионных ПАВ, которые имеют максимум поглощения 210–240 нм, полученный раствор будет иметь показатель 0,1–0,2 по данному соотношению. Рекомендуем не учитывать данный показатель. Чистота образцов по отношению A260/A280 при выделении набором «ЦитоСорб/ CytoSorb» имеет показатель 1,8–2,2.

ДНК – Экстран-2

Набор реагентов предназначен для выделения геномной ДНК из образцов тканей животных

Состав набора

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1 Протеиназа К | 5 Промывочный раствор |
| 2 Лизирующий раствор 2 | 6 Элюирующий раствор |
| 3 Осаждающий раствор 1 | 7 2-Меркаптоэтанол |
| 4 Осаждающий раствор 2 | 8 Гликоген |

Протокол выделения ДНК

Внесение образца

1. Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5 или 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все пробирки (кроме «ОКО-В») внести 5–10 мг свежей или замороженной ткани. В случае выделения из цист нематод — от одной цисты.

Лизис клеток

2. В каждую пробирку внести 20 мкл Лизирующего раствора 2 и максимально растереть ткань в микропробирке тefлоновым пестиком. Добавить по 280 мкл Лизирующего раствора 2 и 1 мкл 2-меркаптоэтанол.
3. Внести в пробирки по 10 мкл раствора Протеиназы К и перемешать на вортексе.
4. Оставить на ночь при температуре 56 °С.

Осаждение белков

5. К лизату добавить 100 мкл Осаждающего раствора 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе 20 секунд.
6. Центрифугировать смесь 5 мин при 13 000 об/мин. На дне пробирки должен образоваться плотный осадок. Если осадок недостаточно плотный, охладить пробирки во льду 1–2 мин и снова центрифугировать.

Осаждение ДНК

7. В чистые пробирки 1,5–2 мл внести по 2 мкл соосадителя ДНК.
8. Супернатант, содержащий ДНК, перенести в полном объеме в пробирки с соосадителем ДНК.
9. Добавить 300 мкл Осаждающего раствора 2 и перемешать переворачиванием (10–12 раз) до появления видимого осадка ДНК.
10. Центрифугировать смесь при 13 000 об/мин 5 мин. Осторожно слить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге.

Промывка и растворение ДНК

11. Добавить 400 мкл Промывочного раствора и перемешать несколько раз переворачиванием для промывки ДНК.
12. Центрифугировать 2 мин при 13 000 об/мин. Осторожно удалить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге.
13. Открытые пробирки подсушить на воздухе или в термостате при 37 °С 10–15 мин до полного высыхания.
14. Добавить к осадку 30–50 мкл Элюирующего раствора. Перемешать и прогреть при 65 °С 5 мин до растворения ДНК. Полученный раствор ДНК хранить при –20 °С. Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4 °С.

ДНК – Экстран-3

Набор реагентов предназначен для выделения геномной ДНК из растений. Выход ДНК составляет 3–4 мкг из 10 мг ткани. Чистота ДНК A260/A280 = 1,8–1,9.

Состав набора

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1 РНКаза 10 мг/мл | 4 Осаждающий раствор 2 |
| 2 Лизирующий раствор 2 | 5 Промывочный раствор 1 |
| 3 Осаждающий раствор 1 | 6 Элюирующий раствор |

Протокол выделения ДНК

Внесение образца

1. Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5/2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все пробирки (кроме «ОКО-В») внести 10–30 мг свежей или замороженной ткани.

Лизис клеток

2. В каждую пробирку добавить 20 мкл Лизирующего раствора и максимально растереть ткань в микропробирке тefлоновым пестиком. Добавить 280 мкл Лизирующего раствора.
3. Внести в пробирки по 3 мкл раствора РНКазы и перемешать на вортексе.
4. Инкубировать 1 час при температуре 60 °С. Остудить пробирки до комнатной температуры.

Осаждение белков

5. К лизату добавить 100 мкл Осаждающего раствора 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе 20 секунд.
6. Центрифугировать смесь при 13 000 об/мин в течение 5 мин. На дне пробирки должен образоваться плотный осадок. Если осадок недостаточно плотный, охладить пробирки во льду 10 мин и снова центрифугировать.

Осаждение ДНК

7. Супернатант, содержащий ДНК, перенести в полном объеме, не задевая осадок, в чистые 1,5 мл пробирки.
8. Добавить 300 мкл Осаждающего раствора 2 и перемешать переворачиванием (8–10 раз) до появления видимого осадка ДНК.
9. Центрифугировать смесь при 13 000 об/мин 5 мин. Осторожно слить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге. Подсушить пробирки в термостате 10–15 мин при 37 °С до полного высыхания.

Промывка и растворение ДНК

10. Добавить 400 мкл Промывочного раствора и перемешать несколько раз переворачиванием.
11. Центрифугировать 2 мин при 13 000 об/мин. Осторожно удалить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге.
12. Открытые пробирки подсушить на воздухе или в термостате при 37 °С 10–15 мин до полного высыхания.
13. Добавить к осадку 30–50 мкл Элюирующего раствора, перемешать и прогреть при 65 °С 5 мин до растворения ДНК.

ФитоСорб

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Рассчитан на 50 выделений, включая контрольные образцы.

Состав набора

- | | |
|------------------------------|-----------------------|
| 1 Экстрагирующий буфер (PBS) | 5 Промывочный раствор |
| 2 Лизирующий раствор | 6 Промывочный раствор |
| 3 Сорбирующий раствор | 7 Элюирующий буфер |
| 4 Осаждающий раствор | 8 Деионизованная вода |

Меры безопасности

Компоненты набора, осаждающий и промывочный растворы (реагенты 5, 6), содержат легко-воспламеняющиеся жидкости.

Описание набора

Набор реагентов «ФитоСорб» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Набор может также использоваться для выделения нуклеиновых кислот фитопатогенов из растительного материала — вирусов, виоидов, бактерий и др. Для гомогенизации (предварительного измельчения образца перед выделением НК) подходят все части растения — лист, корень, стебель и т. д.

Ограничения метода

Перед процедурой экстракции нуклеиновых кислот с помощью набора реагентов исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке биологического материала эффективность выделения НК может быть недостаточной и/или привести к ингибированию при последующем анализе методом ПЦР (ложноотрицательный результат). Ложноотрицательный результат ПЦР выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ДНК (или других аналогичных контрольных компонентов, входящих в коммерческие наборы), содержащегося в реакционной ПЦР-смеси.

Для исключения возможной контаминации, возникающей вследствие ошибок персонала лаборатории при работе с набором и приводящей к получению ложноположительного результата при последующем анализе методом ПЦР-РВ, используются отрицательные контрольные образцы выделения.

При использовании набора в качестве исследуемого материала может быть любой растительный материал, предназначенный для анализа фитопатогенов.

Возможные трудности при выделении НК набором PH-520 «ФитоСорб»:

1. На этапе промывки НК возможно слипание сорбента. В данной ситуации необходимо разрушить конгломерат магнитных частиц с помощью микроцентрифуги-встряхивателя, интенсивность перемешивания может быть увеличена, однако необходимо избегать механического повреждения пробирок.
2. Перенос сорбента в аналитический образец на этапе элюции. В данной ситуации рекомендуется повторить три заключительных пункта этапа Элюция НК. Наличие сорбента в чистом растворе ДНК/РНК уменьшает качество и срок хранения раствора, а также ингибирует биохимические реакции (ПЦР, рестрикция и пр.).

Рекомендованные количества образца^{1,2}

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг
Растение	600–750
Бактериальная инфекция	600–750
Грибная инфекция	600–750
Вирусная/виroidная инфекция	150–300

¹ В случае выделения из сухих частей растения количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза.

² При одновременном исследовании нескольких целевых объектов (например, бактериальная инфекция и вирусная инфекция) следует брать навеску 600–750 мг.

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «ФитоСорб» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

Предварительная подготовка биологического материала

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в стерильную ступку 1–2 мл экстрагирующего буфера.
3. Гомогенизировать необходимое количество образца в стерильной ступке с пестиком до получения однородной массы.
4. Добавить еще 2 мл экстрагирующего буфера в ступку с гомогенным образцом и повторно растереть.
5. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
6. Центрифугировать 4000 об/мин 5 минут.

Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный материал при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в ступку с образцом жидкий азот до уровня 1 см от дна ступки. Инкубировать 10 секунд.
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в ступке с пестиком. Необходимо максимально измельчить навески до состояния «пыли».
4. Убедиться, что ступка комнатной температуры; если ступка холодная, перед добавлением экстрагирующего буфера подождать 2 минуты.
5. Добавить 4 мл экстрагирующего буфера в ступку с исследуемым образцом и повторно растереть образцы до гомогенного состояния.
6. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки.
7. Центрифугировать 4000 об/мин 5 минут.

Примечание: во избежание контаминации после проведения ручной гомогенизации необходимо обрабатывать ступки и пестики дезинфицирующим хлорсодержащим средством.

Проведение анализа

Дальнейшее проведение анализа, этапы *Лизис, Экстракция, Сорбция и осаждение, Промывка, Элюция* выполняются согласно инструкции к набору **РН-520 «ФитоСорб»**.

ФитоСорб-Автомат-48

Набор реагентов для автоматического выделения нуклеиновых кислот из растительного материала на роботизированных станциях TECAN. Рассчитан на 48 выделений, включая контрольные образцы.

Состав набора

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1 Экстрагирующий буфер | 4 Осаждающий раствор |
| 2 Лизирующий раствор | 5 Промывочный раствор 1 |
| 3 Сорбирующий раствор | 6 Элюирующий буфер |

Описание набора

Набор реагентов «ФитоСорб-Автомат-48» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Набор может также использоваться для выделения нуклеиновых кислот фитопатогенов из растительного материала — вирусов, вирионов, бактерий и др. Для гомогенизации (предварительного измельчения образца перед выделением НК) подходят все части растения — лист, корень, стебель и т.д.

Ограничения метода

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «ФитоСорб-Автомат-48» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке биологического материала эффективность выделения НК может быть недостаточной и/или привести к ингибированию при последующем анализе методом ПЦР (ложноотрицательный результат). Ложноотрицательный результат ПЦР выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ДНК (или других аналогичных контрольных компонентов, входящих в коммерческие наборы), содержащегося в реакционной ПЦР-смеси.

Для исключения возможной контаминации, возникающей вследствие ошибок персонала лаборатории при работе с набором и приводящей к получению ложноположительного результата при последующем анализе методом ПЦР-РВ, используются отрицательные контрольные образцы выделения.

Рекомендованные количества образца^{1, 2}

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг
Растение	600–750
Бактериальная инфекция	600–750
Грибная инфекция	600–750
Вирусная/виroidная инфекция	150–300

¹ В случае выделения из сухих частей растения количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза.

² При одновременном исследовании нескольких целевых объектов (например, бактериальная инфекция и вирусная инфекция) следует брать навеску 600–750 мг.

Предварительная подготовка биологического материала

• Ручная гомогенизация без применения жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в стерильную ступку 1–2 мл экстрагирующего буфера.
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы.
4. Добавить еще 2 мл экстрагирующего буфера в ступку с гомогенным образцом и повторно растереть образцы.
5. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
6. Центрифугировать 4000 об/мин 5 минут.

• Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в ступку с образцом жидкий азот до уровня 1 см от дна ступки. Инкубировать 10 секунд.
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в ступке с пестиком. Необходимо максимально измельчить навески до состояния «пыли».
4. Убедиться, что ступка комнатной температуры, в случае если ступка холодная, перед добавлением экстрагирующего буфера подождать 2 минуты.
5. Добавить 4 мл экстрагирующего буфера в ступку с исследуемым образцом и повторно растереть образцы до гомогенного состояния.
6. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл.
7. Центрифугировать 4000 об/мин 5 минут.

Примечание: во избежание контаминации после проведения ручной гомогенизации необходимо обрабатывать ступки и пестики дезинфицирующим хлорсодержащим средством.

Проведение анализа

Дальнейшее выделение ДНК на автоматизированных станциях выполняется согласно инструкциям к набору РН-522 «ФитоСорб-Автомат-48».

ФитоСорб-П

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Рассчитан на 50 выделений при автоматической гомогенизации.

Состав набора

- | | |
|--|-------------------------|
| 1 Пробирки с шариками для гомогенизации и экстрагирующим буфером | 5 Промывочный раствор 1 |
| 2 Лизирующий раствор | 6 Промывочный раствор 2 |
| 3 Сорбирующий раствор | 7 Элюирующий буфер |
| 4 Осаждающий раствор | 8 Деионизованная вода |

Меры безопасности: компоненты набора — осаждающий и промывочный растворы (реагенты 5, 6) — содержат легковоспламеняющиеся жидкости.

Описание набора

Набор реагентов «ФитоСорб-П» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Набор может также использоваться для выделения нуклеиновых кислот фитопатогенов из растительного материала — вирусов, вириодов, бактерий и др. Для гомогенизации (предварительного измельчения образца перед выделением НК) подходят все части растения — лист, корень, стебель и т. д.

Ограничения метода

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «ФитоСорб-П» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке биологического материала эффективность выделения НК может быть недостаточной и/или привести к ингибированию при последующем анализе методом ПЦР (ложноотрицательный результат).

Ложноотрицательный результат ПЦР выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ДНК (или других аналогичных контрольных компонентов, входящих в коммерческие наборы), содержащегося в реакционной ПЦР-смеси.

Для исключения возможной контаминации, возникающей вследствие ошибок персонала лаборатории при работе с набором и приводящей к получению ложноположительного результата при последующем анализе методом ПЦР-РВ, используются отрицательные контрольные образцы выделения.

Рекомендованные количества образца^{1, 2}

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг
Растение	150–250
Бактериальная инфекция	150–250
Грибная инфекция	150–250
Вирусная/виroidная инфекция	100–150

¹ В случае выделения из сухих частей растения количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза.

² При одновременном исследовании нескольких целевых объектов (например, бактериальная инфекция и вирусная инфекция) следует брать навеску 150–250 мг.

Предварительная подготовка биологического материала

Автоматическая гомогенизация

1. Поместить исследуемый растительный образец (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») в пробирку с шариками для гомогенизации и экстрагирующим буфером при помощи стерильного одноразового пинцета.
2. Установить подготовленные пробирки в ротор гомогенизатора Precellys Evolution Bertin Technologies (или аналогичного). Запустить программу гомогенизации: 9500 rpm / 15 sec, pause 30 sec, 4 повтора.
3. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
4. Центрифугировать 5000 об/мин 5 минут.

Примечание: проверьте эффективность гомогенизации образца — не должно присутствовать больших цельных частей растения. В случае недостаточной гомогенизации необходимо повторить пункт 2 этапа «Пробоподготовка. Автоматическая гомогенизация».

Проведение анализа

Дальнейшее проведение анализа, этапы «Лизис», «Сорбция и осаждение», «Промывка», «Элюция» выполняются согласно инструкции к набору **РН-523 «ФитоСорб-П»**.

Возможные трудности при выделении НК набором РН-523 «ФитоСорб-П»

Перенос сорбента в аналитический образец на этапе элюции. В данной ситуации рекомендуется повторить три заключительных пункта этапа «Элюция НК». Наличие сорбента в чистом растворе ДНК/РНК уменьшает качество и срок хранения раствора, а также ингибирует биохимические реакции (ПЦР, рестрикция и пр.).

Фитоскрин-Экспресс

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или их аналогах. Рассчитан на 96 выделений при ручной гомогенизации.

Состав набора

- | | |
|------------------------------|------------------------|
| 1 Экстрагирующий буфер (PBS) | 5 Элюирующий буфер, ЭР |
| 2 Лизирующий раствор, ЛОР | 6 Деионизованная вода |
| 3 Сорбирующий раствор, СР | |
| 4 Промывочный раствор, ПР | |

Меры безопасности: компонент «Лизирующий раствор, ЛОР» классифицируется как опасный. Коды заявленной опасности: химическая продукция, вызывающая поражение/раздражение кожи – H302, H332, H315; химическая продукция, вызывающая повреждения/раздражение глаз – H319; химическая продукция, вызывающая коррозию металла – H290. Компонент набора «Экстрагирующий буфер (PBS)» содержит азид натрия.

Описание набора

Набор реагентов «Фитоскрин-Экспресс» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Набор может также использоваться для выделения нуклеиновых кислот фитопатогенов из растительного материала – вирусов, виридов, бактерий и др. Для гомогенизации (предварительного измельчения образца перед выделением НК) подходят все части растения – лист, корень, стебель и т. д.

Ограничения метода

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «Фитоскрин-Экспресс» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке биологического материала эффективность выделения НК может быть недостаточной и/или привести к ингибированию при последующем анализе методом ПЦР (ложноотрицательный результат).

Ложноотрицательный результат ПЦР выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ДНК (или других аналогичных контрольных компонентов, входящих в коммерческие наборы), содержащегося в реакционной ПЦР-смеси.

Для исключения возможной контаминации, возникающей вследствие ошибок персонала лаборатории при работе с набором и приводящей к получению ложноположительного результата при последующем анализе методом ПЦР-РВ, используются отрицательные контрольные образцы выделения.

При использовании набора в качестве исследуемого материала может быть любой растительный материал, предназначенный для анализа фитопатогенов.

Рекомендованные количества образца^{1, 2}

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг
Растение	600–750
Бактериальная инфекция	600–750
Грибная инфекция	600–750
Вирусная/виroidная инфекция	150–300

¹ В случае выделения из сухих частей растения количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза.

² При одновременном исследовании нескольких целевых объектов (например, бактериальная инфекция и вирусная инфекция) следует брать навеску 600–750 мг.

Предварительная подготовка биологического материала

Ручная гомогенизация без применения жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в стерильную ступку 1–2 мл экстрагирующего буфера, PBS.
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в стерильной ступке с пестиком до получения однородной массы.
4. Добавить еще 2 мл экстрагирующего буфера, PBS в ступку с гомогенным образцом и повторно растереть образцы.
5. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
6. Центрифугировать 4000 об/мин 5 минут.

Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в ступку с образцом жидкий азот до уровня 1 см от дна ступки. Инкубировать 10 секунд.
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в ступке с пестиком. Необходимо максимально измельчить навески до состояния «пыли».
4. Убедиться, что ступка комнатной температуры. Если ступка холодная, перед добавлением экстрагирующего буфера подождать 2 минуты.
5. Добавить 4 мл экстрагирующего буфера, PBS в ступку с исследуемым образцом и повторно растереть образцы до гомогенного состояния.
6. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл.
7. Центрифугировать 4000 об/мин 5 минут.

Примечание: во избежание контаминации после проведения ручной гомогенизации необходимо обрабатывать ступки и пестики дезинфицирующим хлорсодержащим средством.

Пробоподготовка при выделении НК из водных гомогенных образцов

1. Добавить в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки 500 мкл экстрагирующего буфера, PBS.
2. В пробирки с экстрагирующим буфером добавить 200 мкл образца.
3. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.

Фитоскрин-Экспресс

Проведение выделения НК

Дальнейшее проведение анализа ручным методом и на автоматизированных станциях Колибри 48/96, KingFisher Flex System или их аналогах, этапы *Лизис, Сорбция и осаждение, Промывка, Десорбция* выполняются согласно инструкции к набору **PH-524 «Фитоскрин-Экспресс»**.

Протоколы для запуска приборов Колибри 48/96, Thermo Scientific KingFisher Flex и Auto-Pure 96 доступны для скачивания на сайте ООО «НПФ Синтол».



Возможные трудности при выделении НК набором PH-524 «Фитоскрин-Экспресс»:

1. При возникновении «аварии» на каком-либо этапе во время выделения РНК (вытекла жидкость из какой-либо пробирки, капли раствора или образца попали на рабочую поверхность и т. д.) необходимо сменить перчатки и провести деконтаминационные работы.
2. Все реактивы необходимо предварительно довести до комнатной температуры и перемешать плавным переворачиванием.
3. На этапе Сорбция и осаждение НК, Промывка НК (ручной метод выделения) во избежание снижения эффективности выделения и ингибирования ПЦР необходимо полностью отбирать надосадочную жидкость.
4. Перенос сорбента в аналитический образец на этапе Десорбция НК. В данной ситуации рекомендуется повторить три заключительных пункта этапа Десорбция НК. Наличие сорбента в чистом растворе ДНК/РНК уменьшает качество и срок хранения раствора, а также ингибирует биохимические реакции (ПЦР, рестрикция и пр.).

Фитоскрин-Экспресс-П

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или их аналогах.

Состав набора

- | | |
|--|---------------------------|
| 1 Пробирки с шариками для гомогенизации и экстрагирующим буфером | 4 Промывочный раствор, ПР |
| 2 Лизирующий раствор, ЛОР | 5 Элюирующий буфер, ЭР |
| 3 Сорбирующий раствор, СР | 6 Деионизованная вода |

Меры безопасности: компонент «Лизирующий раствор, ЛОР» классифицируется как опасный. Коды заявленной опасности: химическая продукция, вызывающая поражение/раздражение кожи – H302, H332, H315; химическая продукция, вызывающая повреждения/раздражение глаз – H319; химическая продукция, вызывающая коррозию металла – H290. Компонент № 1 набора содержит азид натрия.

Описание набора

Набор реагентов «Фитоскрин-Экспресс-П» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Набор может также использоваться для выделения нуклеиновых кислот фитопатогенов из растительного материала — вирусов, вириодов, бактерий и др. Для гомогенизации (предварительного измельчения образца перед выделением НК) подходят все части растения — лист, корень, стебель и т. д.

Рекомендованные количества образца^{1, 2}

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг
Растение	150–250
Бактериальная инфекция	150–250
Грибная инфекция	150–250
Вирусная/вириодная инфекция	100–150

¹ В случае выделения из сухих частей растения количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза.

² При одновременном исследовании нескольких целевых объектов (например, бактериальная инфекция и вирусная инфекция) следует брать навеску 150–250 мг.

Предварительная подготовка биологического материала

Автоматическая гомогенизация

1. Поместить исследуемый растительный образец (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») в пробирку с шариками для гомогенизации и экстрагирующим буфером при помощи стерильного одноразового пинцета.
2. Установить подготовленные пробирки в ротор гомогенизатора Precellys Evolution Bertin Technologies (или аналогичного). Запустить программу гомогенизации: 9500 rpm / 15 sec, pause 30 sec, 4 повтора.
3. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
4. Центрифугировать 5000 об/мин 5 минут.

Примечание: проверьте эффективность гомогенизации образца — не должно присутствовать больших цельных частей растения. В случае недостаточной гомогенизации необходимо повторить пункт 2 этапа «Автоматическая гомогенизация».

Проведение выделения НК

Дальнейшее проведение анализа ручным методом и на автоматизированных станциях Колибри 48/96, KingFisher Flex System или их аналогах, этапы *Лизис, Сорбция и осаждение, Промывка, Десорбция* выполняются согласно инструкции к набору **РН-526 «Фитоскрин-Экспресс-П»**.

Протоколы для запуска приборов Колибри 48/96, Thermo Scientific KingFisher Flex и Auto-Pure 96 доступны для скачивания на сайте ООО «НПФ Синтол».



Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов, часть 2

Наборы реагентов для ПЦР в реальном времени

Справочная информация

А. Протоколы выявления и дифференциальной диагностики бактерий и фитоплазм методом ПЦР в реальном времени по следующим возбудителям:

1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, кольцевая гниль картофеля PH-001
2. *Ralstonia solanacearum* (раса 3, bv.2) и *Ralstonia solanacearum* (раса 1, bv.1), бурая гниль картофеля PH-002
3. *Candidatus Liberibacter solanacearum*, «зебра чип» PH-019
4. *Ralstonia solanacearum* (раса 3, bv.2), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* (PH-012), бурая и кольцевая гнили картофеля
5. Род бактерий *Dickeya*, черная ножка и мягкая гниль картофеля PH-008
6. *Dickeya solani* и *D. dianthicola*, черная ножка картофеля PH-031
7. *Candidatus Phytoplasma solani*, столбур картофеля и почернение древесины винограда PH-020
8. Род *Pectobacterium*, черная ножка и мягкая гниль PH-032
9. *Pectobacterium wasabiae* и *P. atrosepticum*, черная ножка и мягкая гниль картофеля PH-044
10. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* и *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, черная ножка картофеля PH-029
11. *Acidovorax citrulli*, бактериальная пятнистость тыквенных культур PH-006
12. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактериальный рак томата PH-041
13. *Xylophilus ampelinus*, бактериальное увядание винограда PH-005
14. *Xylella fastidiosa*, бактериоз винограда, болезнь Пирса PH-007
15. *Candidatus Phytoplasma vitis*, золотистое пожелтение винограда PH-023
16. *Candidatus Phytoplasma solani* + *Candidatus Phytoplasma vitis*, почернение древесины и золотистое пожелтение винограда PH-033
17. *Pantoea stewartii*, бактериальный вилт кукурузы PH-004
18. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, бактериальный ожог риса PH-025
19. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, ржаво-бурая пятнистость листьев фасоли PH-038
20. *Pseudomonas fuscovaginae*, бактериальная гниль влагалища листа пшеницы PH-039
21. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, бактериальная полосатость риса PH-046
22. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, бактериальный ожог гороха PH-053
23. *Erwinia amylovora*, ожог плодовых PH-003
24. *Candidatus Phytoplasma mali*, пролиферация яблони PH-021
25. *Candidatus Phytoplasma pyri*, истощение груши PH-022
26. *Candidatus Phytoplasma*, представители группы фитоплазм PH-048
27. *Rathayibacter tritici*, желтый слизистый бактериоз пшеницы PH-057
28. *Xanthomonas hyacinthi*, желтая болезнь гиацинта PH-056
29. *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, угловатая пятнистость фасоли PH-062
30. *Burkholderia caryophylli*, бактериальный вилт гвоздики PH-064
31. *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, черный бактериоз зерновых PH-067
32. *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*, бактериальный ожог фасоли PH-068
33. *Clavibacter nebraskensis*, вилт Госса PH-070

Б. Протоколы выявления и дифференциальной диагностики грибных патогенов методом ПЦР в реальном времени по следующим возбудителям:

1. *Synchytrium endobioticum*, рак картофеля **PH-009**
2. *Cercospora kikuchii*, пурпурный церкоспороз сои **PH-035**
3. Представители рода *Monilinia*, монилиозные гнили плодовых **PH-024**
4. Представители *Colletotrichum acutatum complex* **PH-030**
5. *Stagonosporopsis andigena*, фомозная пятнистость листьев картофеля **PH-052**
6. *Stagonosporopsis chrysanthemi*, аскохитоз хризантем **PH-051**
7. *Tilletia controversa*, карликовая головня пшеницы **PH-054**
8. *Tilletia indica*, индийская головня пшеницы **PH-055**
9. *Diaporthe helianthi*, фомопсис подсолнечника **PH-047**
10. *Diaporthe vaccinii*, вязкая гниль черники **PH-063**
11. *Phytophthora ramorum*, фитофтороз древесных и кустарниковых культур **PH-050**
12. *Puccinia horiana*, белая ржавчина хризантем **PH-059**
13. *Ceratocystis fagacearum*, сосудистый микоз дуба **PH-058**
14. *Stenocarpella maydis*, диплодиоз кукурузы **PH-061**
15. *Bipolaris zeicola*, пятнистость листьев кукурузы **PH-065**
16. *Phytophthora infestans*, фитофтороз **PH-072**
17. *Diaporthe caulivora*, рак стеблей сои **PH-071**
18. *Leptosphaeria maculans*, фомоз рапса **PH-069**
19. *Lecanosticta acicola*, коричневый пятнистый ожог хвои **PH-073**
20. *Hymenoscyphus fraxineus*, суховершинность ясеня **PH-074**

В. Протоколы выявления и дифференциальной диагностики нематод методом ПЦР в реальном времени по следующим возбудителям:

1. *Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis*, бледная и золотистая картофельная нематода **PH-100м**
2. *Bursaphelenchus xylophilus*, сосновая стволовая нематода **PH-102**
3. *Ditylenchus destructor*, стеблевая нематода картофеля **PH-103**
4. *Heterodera glycines*, соевая цистообразующая нематода **PH-104**

Г. Протоколы выявления и дифференциальной диагностики вирусных и вириодных возбудителей болезней растений методом ПЦР в реальном времени совмещенной с реакцией обратной транскрипции по следующим возбудителям:

1. Potato Virus X и Potato Virus Y, X и Y вирусы картофеля **PV-001**
2. Potato Virus M и Potato Leafroll Virus, M вирус картофеля и вирус скрученности листьев картофеля **PV-002**
3. Potato Virus S и Potato Virus A, S и A вирусы картофеля **PV-003**
4. Potato spindle tuber viroid, вириод веретеновидности клубней картофеля **PV-004**
5. Potato Virus X, Y, M, L, S, A, PSTVd, вирусы картофеля X, Y, M, L, S, A и вириод веретеновидности клубней картофеля **PV-005**
6. Potato virus M, Potato virus Y, Potato Virus S, вирусы картофеля M, Y, S **PV-013**
7. Potato mop-top virus, вирус метельчатости верхушек картофеля **PV-014**
8. Andean potato mottle virus, андийский комовирус крапчатости картофеля **PV-011**
9. Andean potato latent virus, андийский латентный вирус картофеля **PV-012**
10. Potato black ringspot virus, вирус черной кольцевой пятнистости листьев картофеля **PV-036**
11. Beet necrotic yellow vein virus, вирус некротического пожелтения жилок сахарной свеклы (ризомания сахарной свеклы) **PH-010**
12. Tomato ringspot virus, вирус кольцевой пятнистости томата **PH-028**

13. Tomato spotted wilt virus, вирус бронзовости (увядания) томата **PH-042**
14. Tomato brown rugose fruit virus, вирус коричневой морщинистости плодов томата **PH-043**
15. Pepino mosaic virus, вирус мозаики томата **PH-045**
16. Barley yellow dwarf virus, вирус желтой карликовости ячменя **PH-017**
17. Barley stripe mosaic virus, вирус штриховатой мозаики ячменя **PH-034**
18. Tobacco ringspot virus, вирус кольцевой пятнистости табака **PH-040**
19. Wheat streak mosaic virus, вирус полосатой мозаики пшеницы **PH-049**
20. Plum pox potyvirus, вирус шарки (оспы) сливы **PH-011**
21. Prunus necrotic ringspot ilarvirus, иларвирус некротической кольцевой пятнистости косточковых **PH-014**
22. Prune dwarf ilarvirus, иларвирус карликовости сливы **PH-015**
23. Raspberry ringspot perovirus, вирус кольцевой пятнистости малины **PH-037**
24. Impatiens necrotic spot virus, вирус некротической пятнистости бальзамина **PH-013**
25. Chrysanthemum stunt pospoviroid, вириод карликовости хризантем **PH-027**
26. Tomato yellow leaf curl disease, бегомовирусы желтой курчавости листьев томата **PH-018**
27. Maize chlorotic mottle virus, вирус хлоротической крапчатости кукурузы **PH-060**
28. Peach latent mosaic viroid, вириод латентной мозаики персика **PH-066**
29. Potato yellowing alfamovirus, вирус пожелтения картофеля **PV-016**

Область применения

Набор реагентов предназначен для обнаружения ДНК/РНК приведенных выше представителей фитопатогенов. Наборы могут быть использованы в лабораторных центрах и институтах, проводящих контроль карантинного фитосанитарного состояния растений, в том числе посадочного материала, в целях обнаружения НК фитопатогенов.

Принцип метода

Обнаружение специфических фрагментов ДНК/кДНК основано на использовании метода мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени — ПЦР-РВ. В основе метода ПЦР-РВ лежит изменение сигнала флуоресценции в ходе реакции. Это изменение происходит благодаря использованию специфичного для искомой ДНК олигонуклеотидного зонда, который, подобно праймеру, в ходе реакции связывается с одной из цепей ампликона.

К 5'- и 3'-концам зонда присоединены флуорофор и гаситель флуоресценции соответственно. При возбуждении молекулы флуорофора светом определённой длины волны данная молекула испускает свет другой длины волны. За счёт близости молекул флуорофора и гасителя флуоресценции, находящихся на одном зонде, последний поглощает флуоресценцию, и изменения аналитического сигнала не происходит.

В результате расщепления специфического для искомой ДНК олигонуклеотидного зонда Taq-полимеразой на этапе элонгации при температурах около 60 °С гаситель прекращает поглощать флуоресценцию данной молекулы флуорофора (технология TaqMan). С каждым циклом ПЦР число освобождённых молекул флуорофора экспоненциально возрастает (рисунок 1).

Обнаружение специфических фрагментов РНК возбудителя основано на использовании сочетания методов обратной транскрипции и мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени — ОТ-ПЦР-РВ. Синтез ДНК на матрице РНК посредством обратной транскрипции производит комплементарную ДНК (кДНК). Обратные транскриптазы (RT) используют шаблон РНК и праймер, комплементарный 3'-концу РНК, чтобы индуцировать синтез первой цепочки кДНК, которая может быть использована непосредственно в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Экспоненциальная амплификация при ПЦР

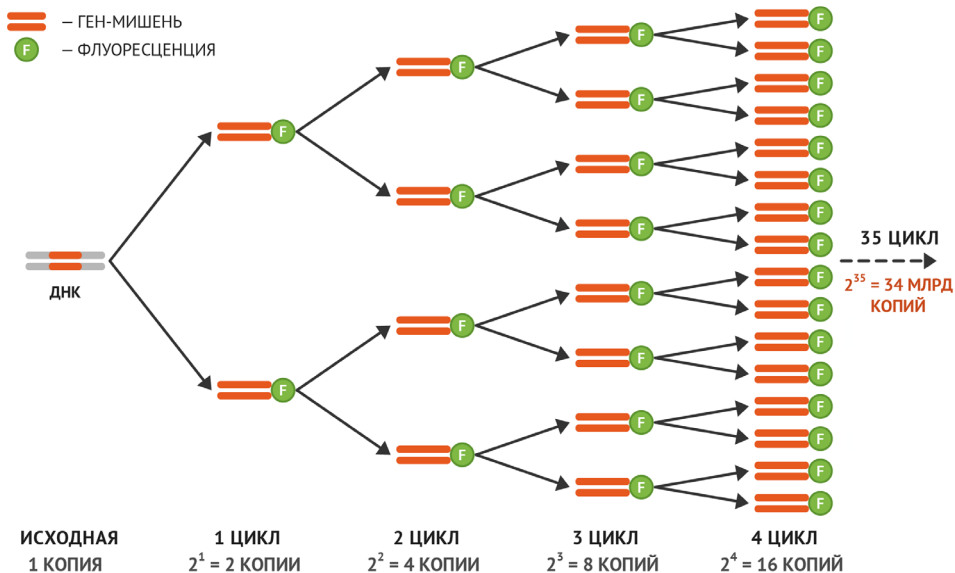


Рисунок 1 – Принцип аналитического процесса.

Меры предосторожности при работе с набором

Работу проводят в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским, биологическим (ветеринарным) или агрономическим образованием, получившего дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- Пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- Не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- После работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды.
- При приеме внутрь компонентов набора реагентов следует немедленно обратиться за медицинской помощью.

Спецификации по безопасности предоставляются по запросу.

Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ — зарегистрированный в РФ и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям **FAM/Green**, **R6G/HEX/Yellow/VIC**, **ROX/Orange**, **Cy5/Red** либо их спектральным аналогам, со следующими характеристиками: $\lambda_{\text{макс.возб.}}$ / $\lambda_{\text{макс.эм.}}$: № 1 — 485 нм/520 нм; № 2 — 530 нм/560 нм; № 3 — 580 нм/620 нм; № 4 — 630 нм/670 нм, например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96».

Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

Дозирующие устройства

- Автоматический (механический) дозатор переменного объема на 10–100 мкл.
- Автоматический (механический) дозатор переменного объема на 100–1000 мкл.
- Автоматический (механический) дозатор переменного объема на 2–20 мкл.
- Штатив для данных дозаторов.

Другое используемое оборудование

- Микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901»).
- Микроцентрифуга для микропробирок (стрипов) 0,2 мл (например, «Циклотемп-903»).
- Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл.
- Штатив для микропробирок 0,2 мл (например, «РМ-2×48×0,2», Синтол).
- Холодильник на 2–8 °С для хранения образцов.

Лабораторная посуда

- Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером.
- Микропробирки (стрипы) 0,2 мл с прозрачной крышкой для ПЦР-РВ.
- Набор реагентов для выделения НК.
- Отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки.
- Комплект средств для обработки рабочего места.

Таблица 1. Типы реакций и целевые каналы детекции

Целевые каналы детекции	ПЦР-РВ	ОТ-ПЦР-РВ
FAM/Green + R6G/ HEX/Yellow/VIC ВПК	PH-001; PH-002; PH-019; PH-020; PH-031; PH-032; PH-009; PH-006; PH-005; PH-007; PH-004; PH-025; PH-035; PH-038; PH-039; PH-046; PH-047; PH-022; PH-003; PH-030; PH-048; PH-050; PH-051; PH-052; PH-053; PH-054; PH-103; PH-104; PH-061; PH-063; PH-064; PH-065; PH-067; PH-068; PH-069; PH-070; PH-071; PH-074	PV-004; PV-011; PV-012; PV-036; PH-010; PH-028; PH-042; PH-043; PH-045; PH-017; PH-040; PH-049; PH-011; PH-014; PH-015; PH-037; PH-013; PH-027; PH-060; PH-066; PV-016
FAM/Green + ROX/ Orange + R6G/HEX/ Yellow/VIC ВПК	PH-012; PH-008; PH-044; PH-018; PH-033; PH-024	PV-001; PV-002; PV-003
ROX/Orange + R6G/ HEX/Yellow/VIC ВПК	PH-023; PH-021; PH-056	PH-034; PV-014
FAM/Green + ROX/ Orange + R6G/HEX/ Yellow/VIC + Cy5/ Red ВПК	PH-029	PV-013
R6G/HEX/Yellow/VIC + Cy5/Red ВПК	PH-058; PH-102	-
FAM/Green + ROX/ Orange + Cy5/Red ВПК	PH-100м	-
ROX/Orange + Cy5/ Red ВПК	PH-041	-
FAM/Green + Cy5/ Red ВПК	PH-055; PH-057; PH-059; PH-062; PH-072; PH-073	-

Проведение анализа

Подготовка к проведению ПЦР-РВ

Жидкие реакционные смеси с ферментом SynTaq / TM+ / SynTaq+RT

1. Разморозить необходимое количество пробирок с реакционной смесью (каждая пробирка рассчитана на постановку 50 реакций), выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель.

- **Для наборов реагентов с лиофилизированным ПКО:** подготовить пробирку с лиофилизированным положительным контрольным образцом (ПКО). Приготовление контрольного образца: в пробирку с сухим содержимым ПКО добавить 100 мкл ОКО, перемешать на вортексе до полного растворения, центрифугировать 5 секунд при 3000 об/мин. Хранить разведённый препарат ПКО при температуре не выше -20 °С.

2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать:

- **21 × (N + 2) мкл реакционной смеси;**
- **0,5 × (N + 2) мкл фермента (SynTaq (ДНК-полимераза) / TM+ — для ПЦР-РВ; SynTaq+RT (ДНК-полимераза + обратная транскриптаза) — для ОТ-ПЦР-РВ),**

где N — количество исследуемых образцов, включая ОКО-В; 2 — количество контролей (ПКО, ОКО) (в случае, если контролей больше чем два, необходимо провести расчёт, отталкиваясь от количества контролей в наборе реагентов).

Примечание: Отрицательные контроли выделения (ОКО-В) анализируют как исследуемые образцы, сохраняя при ПЦР-РВ порядок образцов и ОКО-В, который был при выделении НК.

Для удобства расчёта воспользуйтесь таблицей (расчёт на два контроля):

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PC	63	84	105	126	147	168	189	210	231	252	273	294
Фермент	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7
N	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
PC	315	336	357	378	399	420	441	462	483	504	525	546
Фермент	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13
N	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
PC	567	588	609	630	651	672	693	714	735	756	777	798
Фермент	13,5	14	14,5	15	15,5	16	16,5	17	17,5	18	18,5	19
N	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
PC	819	840	861	882	903	924	945	966	987	1008	1029	1050
Фермент	19,5	20	20,5	21	21,5	22	22,5	23	23,5	24	24,5	25

3. ПКО, ОКО и исследуемые образцы разморозить, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать.

Примечание: Если образец ДНК содержит сорбент (магнитный сорбент), необходимо центрифугировать образцы в течение 1 минуты при 10–14 тыс. об/мин для полного осаждения сорбента. При использовании магнитного сорбента пробирки с ДНК после центрифугирования установить в магнитный штатив и добавление образцов производить, не вынимая пробирки из штатива.

Внести в подготовленные пробирки объемом 0,2 мл по 5 мкл ОКО, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, ПКО, используя наконечники с аэрозольным барьером; плотно закрыть крышки, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать пробирки для сброса капель.

4. Поместить пробирки в амплификатор в рекомендуемом порядке:

№ ячейки	Образец
1	ПКО
2	ОКО
3	Исследуемый образец 1
4	Исследуемый образец 2
...	...

В случае если в наборе реагентов несколько ПКО, в первые пробирки вносятся положительные контроли.

Подготовка к проведению ПЦР-РВ для набора РН-073 «*Lecanosticta acicola*-РВ»

1. Следовать пункту 1 раздела **Подготовка к проведению ПЦР-РВ. Жидкие реакционные смеси.**

2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать:

- **21 × (N + 2) мкл** реакционной смеси «*L. acicola*-ВПК»
- **1 × (N + 2)** фермента SynTaq ДНК-полимеразы **T+**,

где N – количество исследуемых образцов, включая ОКО-В, 2 – количество контролей (ПКО, ОКО).

Для удобства расчета воспользуйтесь таблицей:

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PC	63	84	105	126	147	168	189	210	231	252	273	294
T+	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
N	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
PC	315	336	357	378	399	420	441	462	483	504	525	546
T+	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
N	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
PC	567	588	609	630	651	672	693	714	735	756	777	798
T+	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
N	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
PC	819	840	861	882	903	924	945	966	987	1008	1029	1050
T+	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50

3. Далее следовать пунктам 3-4 раздела **Подготовка к проведению ПЦР-РВ. Жидкие реакционные смеси.**

Подготовка к проведению ПЦР-РВ

Жидкие реакционные смеси с ферментом RPol

1. Разморозить необходимое количество пробирок с реакционной смесью (каждая пробирка рассчитана на постановку 50 реакций), выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель.
 - **Для наборов реагентов с лиофилизированным ПКО:** подготовить пробирку с лиофилизированным положительным контрольным образцом (ПКО). Приготовление контрольного образца: в пробирку с сухим содержимым ПКО добавить 100 мкл ОКО, перемешать на вортексе до полного растворения, центрифугировать 5 секунд при 3000 об-мин-1. Хранить разведённый препарат ПКО при температуре не выше минус 20 °С.
2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать:
 - **21 × (N + 2) мкл реакционной смеси;**
 - **0,2 × (N + 2) мкл RPol** (смесь ферментов) – для ОТ-ПЦР-РВ,

где N – количество исследуемых образцов, включая ОКО-В, 2 – количество контролей (ПКО, ОКО) (в случае, если контролей больше чем два, необходимо провести расчёт, отталкиваясь от количества контролей в наборе реагентов).

Примечание. Отрицательные контроли выделения (ОКО-В) анализируют как исследуемые образцы, сохраняя при ПЦР-РВ порядок образцов и ОКО-В, который был при выделении НК.

Для удобства расчёта воспользуйтесь таблицей (расчёт на два контроля):

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PC	63	84	105	126	147	168	189	210	231	252	273	294
RPol	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2	2,2	2,4	2,6	2,8
N	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
PC	315	336	357	378	399	420	441	462	483	504	525	546
RPol	3	3,2	3,4	3,6	3,8	4	4,2	4,4	4,6	4,8	5	5,2
N	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
PC	567	588	609	630	651	672	693	714	735	756	777	798
RPol	5,4	5,6	5,8	6	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6
N	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
PC	819	840	861	882	903	924	945	966	987	1008	1029	1050
RPol	7,8	8	8,2	8,4	8,6	8,8	9	9,2	9,4	9,6	9,8	10

Полученную смесь перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать в течение нескольких секунд. Разлить полученную смесь по 20 мкл в пробирки на 0,2 мл.

Далее следовать пункту 3 раздела **Подготовка к проведению ПЦР-РВ. Жидкие реакционные смеси.**

Подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ

Сухие смеси

1. Набор реагентов извлечь из холодильника. РБ и ОКО перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при 3000 об/мин. Установить необходимое количество микропробирок с реакционной смесью в штатив (количество микропробирок соответствует числу исследуемых проб и контрольных образцов: ПКО, ОКО, ОКО-В) и маркировать в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке либо на крышке пробирки (в зависимости от прибора).
2. Открыть крышки микропробирок и внести в них по 15 мкл РБ.
3. Подготовить пробирку с лиофилизированным положительным контрольным образцом (ПКО).
4. Приготовление контрольного образца: в пробирку с сухим содержимым добавить **200 мкл ОКО**, перемешать на вортексе до полного растворения, центрифугировать 5 секунд при 3000 об/мин.
5. **ПКО** (если уже разведён), **ОКО** и исследуемые образцы разморозить, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать.

***Примечание.** Если образец РНК содержит сорбент (магнитный сорбент), необходимо центрифугировать образцы в течение 1 минуты при 10–14 тыс. об/мин для полного осаждения сорбента. При использовании магнитного сорбента пробирки с РНК после центрифугирования установить в магнитный штатив и добавление образцов производить, не вынимая пробирки из штатива. Используя накопечники с аэрозольным барьером, последовательно внести в микропробирки согласно их маркировке по 10 мкл ОКО, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, ПКО (см. п. 3); плотно закрыть крышки, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать пробирки для сброса капель.*

Далее следовать пункту 4 раздела **Подготовка к проведению ПЦР-РВ. Жидкие реакционные смеси.**

Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ

Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ для приборов RotorGene 6000/RotorGeneQ

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «Rotor-Gene».
3. В окне «New Run / Новый тест» выбрать вкладку «Advanced / Детальный мастер», затем опцию «Empty Run / Пустой шаблон» и нажать «New / Новый».
4. В открывшемся окне выбрать тип ротора «36-Well Rotor / 36-луночный ротор» и поставить галочку в окне «Locking Ring Attached / Кольцо закреплено», нажать «Next / Далее».
5. В открывшемся окне установить «Reaction Volume / Объем реакции» 25 мкл, убрать галочку «15 µL oil layer volume / Объем масла / воска» и нажать «Next / Далее».
6. В открывшемся окне нажать кнопку «Edit Profile / Редактор профиля», нажать «New / Новый» и выбрать «Cycling (default) / Циклирование (по умолч.)».

Задать программу амплификации со следующими параметрами:

Для ПЦР-РВ

Шаг	Температура	Время	Детекция	Красители	Цикл повторить
Hold	95 °C	5 mins			1
Cycling	95 °C	15 secs	No acquiring		50;**
	60 °C	40 secs	Acquiring	Таблица 1	

* – количество циклов при использовании набора реагентов PH-047 можно сократить до 45

** – количество циклов при использовании набора реагентов PH-102 можно сократить до 40

Для ОТ-ПЦР-РВ

Шаг	Температура	Время	Детекция	Красители	Повторов
Hold	45 °C	15 mins			1
Hold 2	95 °C	5 mins			1
Cycling	95 °C	15 secs	No acquiring		50*
	60 °C	40 secs	Acquiring	Таблица 1	

* – количество циклов при использовании наборов реагентов PH-042, PH-043, PH-045 можно сократить до 40

Для ПЦР-РВ наборов реагентов PH-029; PH-004

Шаг	Температура	Время	Детекция	Красители	Цикл повторить
Hold	95 °C	5 mins			1
Cycling	95 °C	15 secs	No acquiring		50
	62 °C	40 secs	Acquiring	Таблица 1	

Для ПЦР-РВ наборов реагентов PH-100м

Шаг	Температура	Время	Детекция	Красители	Цикл повторить
Hold	95 °C	5 mins			1
Cycling	95 °C	15 secs	No acquiring		45
	53 °C	40 secs	Acquiring	Таблица 1	

Для ПЦР-РВ наборов реагентов PH-055; PH-062

Шаг	Температура	Время	Детекция	Красители	Цикл повторить
Hold	95 °C	5 mins			1
Cycling	95 °C	15 secs	No acquiring		50
	64 °C	40 secs	Acquiring	Таблица 1	

7. В окне **«Edit Profile / Редактор профиля»** нажать кнопку **«ОК»**.
8. Установить чувствительность прибора в области настроек **«Channel Setup / Установка канала»**. В окне **«New Run Wizard / Мастер нового теста»** нажать **«Gain Optimization / Оптимизация уровня сигнала»**. В открывшемся окне найти и нажать на вкладку **«Channel Settings / Установки каналов»**. В появившемся списке каналов выбрать **«All Channels / Все каналы»** и нажать **«Add / Добавить»**. В появившемся окне **«Auto-Gain Optimization Channel Settings / Установки Авто-оптимизации уровня сигнала»** нажать **«ОК / ДА»** для каждого канала.

После закрытия окна **«Auto-Gain Optimization Channel Settings / Установки Авто-оптимизации уровня сигнала»** поставить галочку **«Perform Optimization Before 1st Acquisition / Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции»** и нажать **«Close / Закрыть»**.

9. Нажать клавишу **«Next / Далее»**.
10. Запустить амплификацию кнопкой **Start run / Старт**.
11. В появившемся после начала работы прибора окне со сведениями об образцах внести названия образцов, в столбце **«Type / Тип»** указать **«Unknown / Образец»** для образцов, **«Positive / Положительный»** для ПКО и **«Negative / Отрицательный»** для ОКО. Нажать клавишу **«Finish / Закончить»**.
12. По завершении ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ для прибора CFX96

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу **«Bio-Rad CFX Manager/Bio-Rad CFX Maestro»**.
3. В меню **File/Файл** выбрать **New/Создать->Protocol/Протокол**.

В появившемся окне задать циклограмму со следующими параметрами:

Для ПЦР-РВ

Объем реакции 25 µl

Шаг	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
1	95 °C	5:00	1	
2	95 °C	0:15	50*	
3	60 °C	0:40		Включена

Для ПЦР-РВ наборов реагентов RH-029; RH-004

Объем реакции 25 µl

Шаг	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
1	95 °C	5:00	1	
2	95 °C	0:15	50	
3	62 °C	0:40		Включена

Для ПЦР-РВ набора реагентов RH-100M

Объем реакции 25 µl

Шаг	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
1	95 °C	5:00	1	
2	95 °C	0:15	45	
3	53 °C	0:40		Включена

Для ПЦР-РВ наборов реагентов RH-055; RH-062

Объем реакции 25 µl

Шаг	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
1	95 °C	5:00	1	
2	95 °C	0:15	50	
3	64 °C	0:40		Включена

* – количество циклов при использовании набора реагентов RH-047 можно сократить до 44.

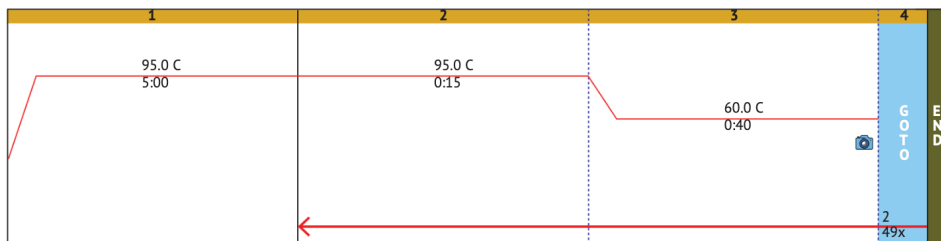
* – количество циклов при использовании набора реагентов RH-102 можно сократить до 39.

Для ОТ-ПЦР-РВ

Объем реакции 25 µl

Шаг	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
1	45 °C	15:00	1	
2	95 °C	5:00	1	
3	95 °C	0:15	50**	
4	60 °C	0:40		Включена

** – количество циклов при использовании наборов реагентов RH-042, RH-043, RH-045 можно сократить до 39.



Пример заданной программы амплификации

Нажать **ОК** и сохранить протокол на компьютере в удобной рабочей папке.

4. Внести сведения об образцах и красителях. Для этого во вкладке **Plate/Плашка** выбрать опцию **Create New/Создать**.

5. Нажать кнопку **Select Fluorophores/Выбрать флуорофоры**. В появившемся окне выбрать красители (**Таблица 1**). Нажать **ОК**.

6. Обозначить на плашке месторасположение образцов:

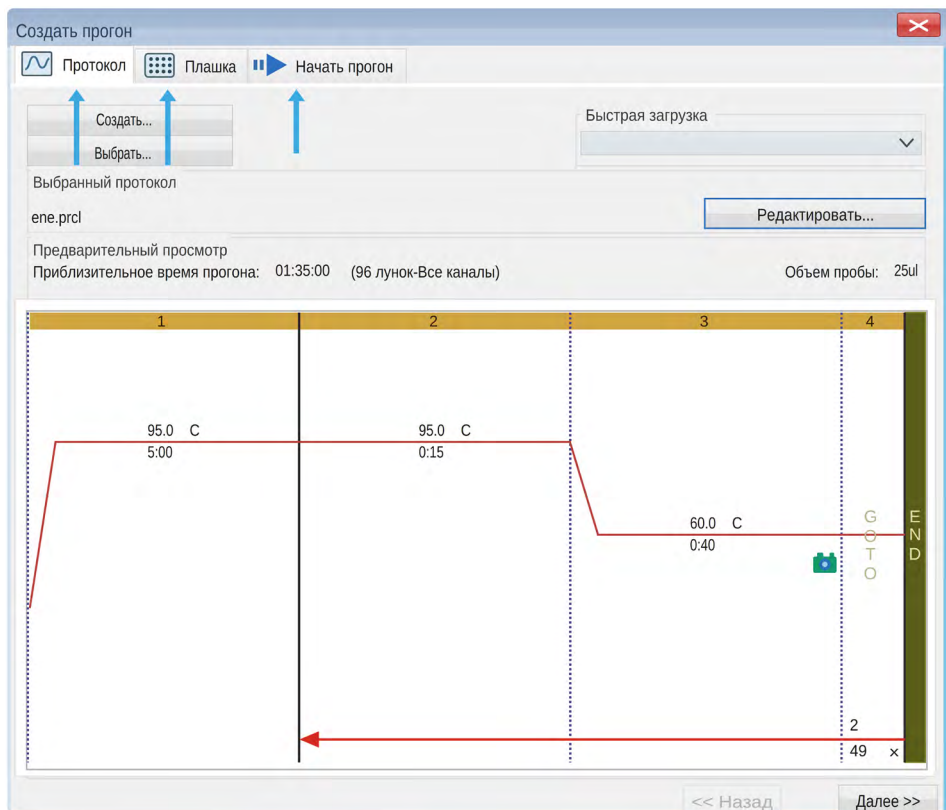
- Первая лунка — **ПКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ПКО, и в графе **Sample Type/Тип пробы** выбрать строчку **Positive Control/Положительный контроль**.
- Вторая лунка — **ОКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ОКО, и в графе **Sample Type/Тип пробы** выбрать строчку **Negative Control/Отрицательный контроль**.
- Следующая лунка — исследуемый образец 1, затем — исследуемый образец 2 и т.д. в соответствии с разделом «**Порядок следования образцов**» (п.4 стр.39). Для этого выделить все оставшиеся лунки, в которых находятся пробирки с образцами, и в графе **Sample Type/Тип пробы** выбрать строчку **Unknown/Неизвестен**.

7. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям. Для этого выделить на плашке лунки со всеми исследуемыми пробирками (включая ПКО и ОКО) и в графе **Target Name/Имена мишеней** поставить галочки в колонке **Load/Загрузить** напротив названий всех выбранных в **Таблице 1** красителей.

8. Задать названия всех исследуемых образцов. Для этого выделить лунки, в которых находятся пробирки с обозначаемым образцом. В графе **Sample Name/Имена проб** ввести (или выбрать из уже имеющихся) имя соответствующего образца. Затем поставить галочку в соседней графе **Load/Загрузить**. Повторить то же самое для оставшихся образцов.

9. Нажать **ОК**. Дать имя плашке с указанием даты эксперимента и сохранить полученный файл на компьютере в удобной рабочей папке.

10. Начать работу прибора. Для этого выбрать закладку **Start Run/Начать прогон**, в которой нажать клавишу **Start Run/Начать прогон**. Задать имя будущего файла с указанием даты проведения эксперимента. Сохранить файл на компьютере в удобной рабочей папке.



11. Зафиксировать в рабочем журнале название файла.

12. По завершении ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ



Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ для приборов АНК-32 (32М, 48)

- 1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
- 2. Запустить программу **ANK Shell**.
- 3. Выбрать вкладку «Быстрый старт».



- 4. В появившемся окне выбрать красители (**Таблица 1**). Задать имя будущего файла, а также выбрать тип прибора (32 пробирки или 48 пробирок).

ОбщееАмплификаторОбразцы

Название

Быстрый старт

Название реакции

Реактор1

Прибор

48 пробирок

Красители

Краситель	ДНК-мишень	1	1
✓ FAM	FAM	485	520
✓ R6G	R6G	530	560
✓ ROX	ROX	580	620
✓ Cy5	Cy5	630	670
Cy5.5	Cy5.5	660	700
FAM-R6G	FAM-R6G	485	560
TAMRA	TAMRA	530	620
R6G-ROX	R6G-ROX	530	620
FAM-R6G	FAM-R6G	485	560
FAM-ROX	FAM-ROX	485	620
600/650	600/650	600	650

5. В окне «Амплификатор» задать программу амплификации.

Для ПЦР-РВ

Тип	Температура	Время, сек.	Наблюдение	Расчет
Изотерма				
1	95 °C	300	Включено	
Циклограмма (50)				
1	95 °C	15	Включено	
2	60 °C	40	Включено	Включено

* – количество циклов при использовании набора реагентов РН-047 можно сократить до 45

* – количество циклов при использовании набора реагентов РН-102 можно сократить до 40

Для ОТ-ПЦР-РВ

Тип	Температура	Время, сек.	Наблюдение	Расчет
Изотерма				
1	45 °C	900	Включено	
2	95 °C	300	Включено	
Циклограмма (50*)				
1	95 °C	15	Включено	
2	60 °C	40	Включено	Включено

* – количество циклов при использовании наборов реагентов РН-042, РН-043, РН-045 можно сократить до 40.

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-029; РН-004

Тип	Температура	Время, сек.	Наблюдение	Расчет
Изотерма				
1	95 °C	300	Включено	
Циклограмма (50)				
1	95 °C	15	Включено	
2	62 °C	40	Включено	Включено

Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-100м

Тип	Температура	Время, сек.	Наблюдение	Расчет
Изотерма				
1	95 °C	300	Включено	
Циклограмма (45)				
1	95 °C	15	Включено	
2	53 °C	40	Включено	Включено

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-055; РН-062

Тип	Температура	Время, сек.	Наблюдение	Расчет
Изотерма				
1	95 °C	300	Включено	
Циклограмма (50)				
1	95 °C	15	Включено	
2	64 °C	40	Включено	Включено

Общие | Амплификатор | Образцы

Изотерма Циклограмма Плавление

Изотерма

Температура - 45,0 + Время - 900 +

Изотерма

Температура - 95,0 + Время - 300 +

Циклограмма

Температура - 95,0 + Время - 15 +

Температура - 60,0 + Время - 40 +

Пример заданной программы амплификации

6. Во вкладке «Образцы» внести описание исследуемых образцов и расставить образцы по планшету. После внесения образцов нажать «Применить».

Быстрый старт

Общие | Амплификатор | Образцы

	1	2	3	4	5	6	7	8	№	Тип	Повторы	Описание	Реактор
A									1	ПКО		ПКО1	Реактор1
									2	ОКО		ОКО1	Реактор1
B									3	ИО		Образцы	Реактор1
									4	ИО		Образцы	Реактор1
									5	ИО		Образцы	Реактор1
									6	ИО		Образцы	Реактор1
C									7	ИО		Образцы	Реактор1
									8	ИО		Образцы	Реактор1
									9	ИО		Образцы	Реактор1
									10	ИО		Образцы	Реактор1
D									11	ИО		Образцы	Реактор1
									12	ИО		Образцы	Реактор1
									13	ИО		Образцы	Реактор1
									14	ИО		Образцы	Реактор1
E									15	ИО		Образцы	Реактор1
									16	ИО		Образцы	Реактор1
									17	ИО		Образцы	Реактор1
									18	ИО		Образцы	Реактор1
F									19	ИО		Образцы	Реактор1
									20	ИО		Образцы	Реактор1
									21	ИО		Образцы	Реактор1
									22	ИО		Образцы	Реактор1
									23	ИО		Образцы	Реактор1
									24	ИО		Образцы	Реактор1
									25	-			Реактор1
									26	-			Реактор1
									27	-			Реактор1
									28	-			Реактор1
									29	-			Реактор1

Концентрация

Тип образца (ов)

Описание

7. Занести в рабочий журнал название файла данных, соответствующее исследованию.

8. Для запуска исследования нажать **Старт**.

Новое исследование

Старт

Файл данных: 2022_06_06_12_35_Быстрый старт

Номер серии:

Комментарий:

Прибор: ANK-48

Шаблон: Быстрый старт "FAM" "R6G" "ROX" "Cy5"

	1	2	3	4	5	6	7	8
▶ A	ПК01  Раствор1 Образец	ОК01  Раствор1 Образец	 Образец Раствор1 Образец	 Образец Раствор1 Образец	 Образец Раствор1 Образец	 Образец Раствор1 Образец	 Образец Раствор1 Образец	 Образец Раствор1 Образец
B	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец
C	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец	 Раствор1 Образец
D	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕
E	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕
F	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕






9. По завершении ПЦР-PV/OT-ПЦР-PV отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ

Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ для приборов ДТпрайм/ДТлайт



1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «RealTime_PCR».
3. Перед проведением амплификации необходимо заполнить протокол исследования (вкладка «Протокол»). В каждой строке необходимо отредактировать следующие данные:
 - № (номер пробирки)
 - R (добавление дублей)
 - Тип пробирки (образец, положительный контроль, отрицательный контроль и т.д.)
 - Флуорофоры (Таблица 1)

Режим Тест Настройки Помощь

ПротоколЗапуск программы амплификации

Номер протокола: Имя Оператора:

	№	Идентификатор	R	Тест	Тип пробирки	Концентрация	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
A1	1	K+	☐		K+	-	-	-	-	-	-
B1	2	K-	☐		K-	-	-	-	-	-	-
C1	3	Образец	☐			-	-	-	-	-	-
							-	-	-	-	-

4. После заполнения таблицы с данными о пробирках необходимо указать расположение пробирок в блоке амплификатора. Расположение пробирок в блоке амплификатора схематично отображается в правой нижней части окна.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5. Запуск программы амплификации осуществляется во вкладке «Запуск программы амплификации».
6. Перед запуском необходимо выбрать или создать программу амплификации.

Для ПЦР-РВ

№ блока	Температура	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	95 °С	5	0	1	
2	95 °С	0	15	50*	
	60 °С	0	40		V

* – количество циклов при использовании набора реагентов РН-047 можно сократить до 45

* – количество циклов при использовании набора реагентов РН-102 можно сократить до 40

Для ОТ-ПЦР-РВ

№ блока	Температура	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	45 °С	15	0	1	
2	95 °С	5	0		
	95 °С	0	15	50**	
	60 °С	0	40		V

** – количество циклов при использовании наборов реагентов РН-042, РН-043, РН-045 можно сократить до 40

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-029; РН-004

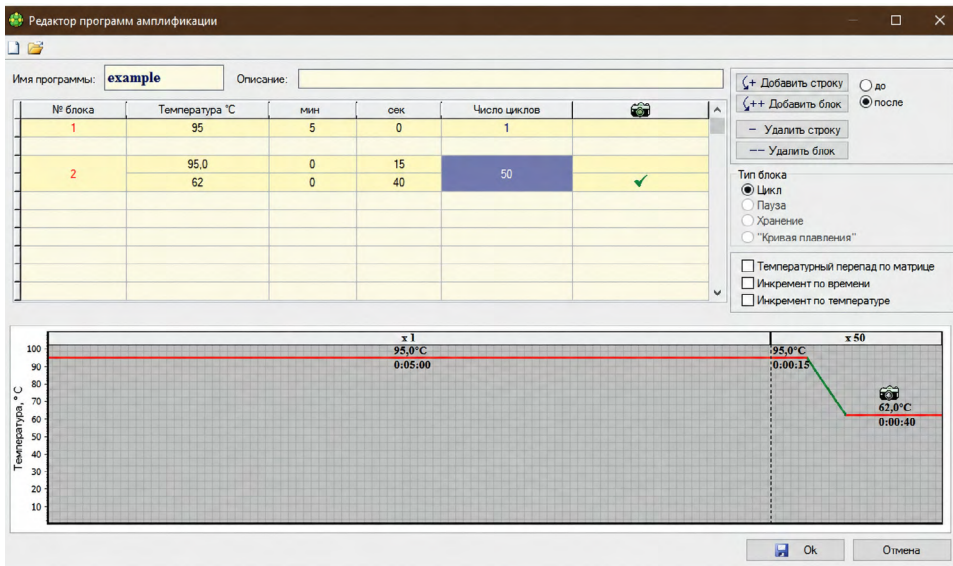
№ блока	Температура	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	95 °С	5	0	1	
2	95 °С	0	15	50	
	62 °С	0	40		V

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-100м

№ блока	Температура	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	95 °С	5	0	1	
2	95 °С	0	15	45	
	53 °С	0	40		V

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-055; РН-062

№ блока	Температура	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	95°С	5	0	1	
2	95 °С	0	15	50	
	64 °С	0	40		V



Пример заданной программы амплификации

- Отредактировать объём рабочей смеси в пробирке (**25 мкл**).

Программа: **EXAMPLE_1**

Объём рабочей смеси: мкл

Комментарий:

Запуск программы

Открыть блок

Заккрыть блок

- Нажать кнопку **«Запуск программы»**.

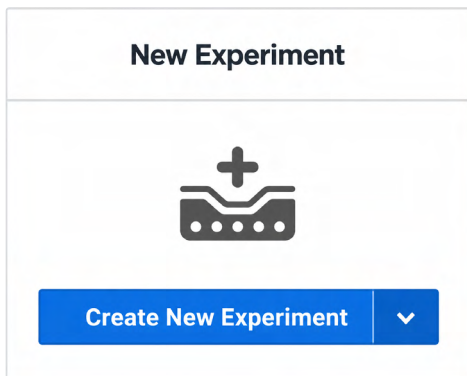
- По завершении ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ

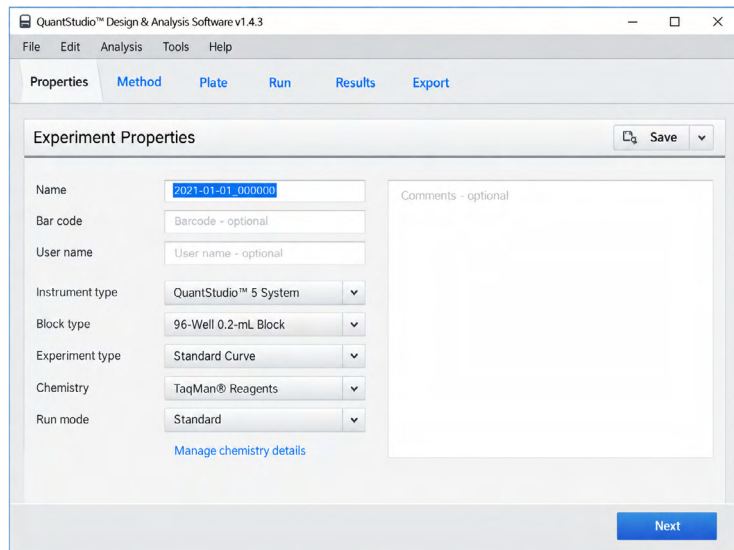
Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ для прибора [QuantStudio5](#)



1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «**QuantStudio Designs & Analysis Software**».
3. Нажать кнопку Создать эксперимент (**Create New Experiments**).



4. Во вкладке **Свойства (Properties)** в строке **Название (Name)** задать имя (название) эксперименту. Нажать внизу окна кнопку **Далее (Next)**.



5. Во вкладке **Протокол (Method)** задать циклограмму со следующими параметрами:

- **Объем (Volume) 25 µl**

Для ПЦР-РВ

Шаг	Стадия	Температура	Время	Время изменения температуры	Регистрация сигнала	Число циклов
1	Удержание	95°C	05:00	3,18°C/s		-
1	ПЦР	95°C	00:15	3,18°C/s		50*
2	ПЦР	60°C	00:40	2,44°C/s	Вкл.	

* — количество циклов при использовании набора реагентов РН-047 можно сократить до 45

* — количество циклов при использовании набора реагентов РН-102 можно сократить до 40

Для ОТ-ПЦР-РВ

Шаг	Стадия	Температура	Время	Время изменения температуры	Регистрация сигнала	Число циклов
1	Удержание	45°C	15:00	3,18°C/s		-
2	Удержание	95°C	05:00	3,18°C/s		-
1	ПЦР	95°C	00:15	3,18°C/s		50**
2	ПЦР	60°C	00:40	2,44°C/s	Вкл.	

** — количество циклов при использовании наборов реагентов РН-042, РН-043, РН-045 можно сократить до 40

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-029; РН-004

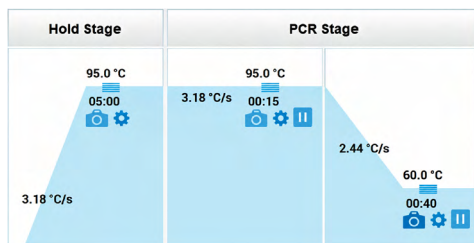
Шаг	Стадия	Температура	Время	Время изменения температуры	Регистрация сигнала	Число циклов
1	Удержание	95°C	05:00	3,18°C/s		-
1	ПЦР	95°C	00:15	3,18°C/s		50
2	ПЦР	62°C	00:40	2,44°C/s	Вкл.	

Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-100м

Шаг	Стадия	Температура	Время	Время изменения температуры	Регистрация сигнала	Число циклов
1	Удержание	95°C	05:00	3,18°C/s		-
1	ПЦР	95°C	00:15	3,18°C/s		45
2	ПЦР	53°C	00:40	2,44°C/s	Вкл.	

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-055; РН-062

Шаг	Стадия	Температура	Время	Время изменения температуры	Регистрация сигнала	Число циклов
1	Удержание	95°C	05:00	3,18°C/s		-
1	ПЦР	95°C	00:15	3,18°C/s		50
2	ПЦР	64°C	00:40	2,44°C/s	Вкл.	



Пример заданной программы амплификации

6. Нажать кнопку **Далее (Next)**.



7. В открывшемся окне во вкладке **Быстрая Настройка (Quick Setup)** в графе **Пассивный референтный краситель (Passive Reference)** выбрать **НЕТ (None)**, нажав на стрелку.

Plate Attributes

Passive Reference None ▼

8. Во вкладке **Расширенные настройки/Advanced Setup** в блоке **Мишени/Targets** добавить каналы для считывания флуоресценции (**Таблица 1**). Для этого необходимо выполнить следующие действия:

- **Для канала FAM**

В первой строке в графе **Название/Name** вместо **Target 1** написать **FAM**. В графе **Репортер/Reporter** выбрать **FAM**. В графе **Гаситель/Quencher** выбрать **None**, нажав на ячейку.

- **Для канала HEX/R6G**

Нажать на кнопку **Добавить/Add**. В появившейся строке в графе **Репортер/Reporter** выбрать **VIC**. В графе **Название/Name** написать **HEX**. В графе **Гаситель/Quencher** выбрать **None**, нажав на ячейку.

- **Для канала ROX**

Нажать на кнопку **Добавить/Add**. В появившейся строке в графе **Репортер/Reporter** выбрать **ROX**. В графе **Название/Name** написать **ROX**. В графе **Гаситель/Quencher** выбрать **None**, нажав на ячейку.

- **Для канала Cy5**

Нажать на кнопку **Добавить/Add**. В появившейся строке в графе **Репортер/Reporter** выбрать **Cy5**. В графе **Название/Name** написать **Cy5**. В графе **Гаситель/Quencher** выбрать **None**, нажав на ячейку.

Quick Setup		Advanced Setup					
		Targets					
				Add		Action	
		Name	Reporter	Quencher	Comments	Task	Quantity
☐		FAM	FAM	None		▼	✕
☐		HEX/R6G	VIC	None		▼	✕
☐		ROX	ROX	None		▼	✕
☐		CY5	CY5	None		▼	✕

9. Далее перейти к блоку **Образцы/Sample**. Для удобства ввод образцов производится в таблице Excel (доступен на сайте ООО «НПФ Синтол» <http://www.syntol.ru/>) либо в программах **Design and Analysis** или **QuantStudio™ Design & Analysis Software**.

10. Скопировать получившуюся таблицу Excel в программу прибора. Выделить все образцы и в таблице поставить галочки возле флуоресцентных красителей. Нажать кнопку **Далее/Next**.

11. Начать работу прибора. Для этого нажмите на кнопку **Начать прогон/Start Run** и выбрать нужный серийный номер прибора. Задать имя будущего файла с указанием даты проведения эксперимента. Сохранить файл на компьютере в удобной рабочей папке.

12. По завершении ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ отработанные пробы утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ



Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ для прибора **Gentier 96E/R**

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу **Real-time PCR System**.
3. Нажать **New Experiment**.
4. В открывшемся окне задать Имя эксперимента/**Experiment Name** и выбрать папку для сохранения **/Save Path**.
5. Нажать **New**.
6. Во вкладке **Run Setting** задать программу амплификации со следующими параметрами:

Для ПЦР-РВ

Stage	Stage Type	Cycle	Time	Temperature	Fluorescence
1	Preincubation	1	05:00	95 °C	None
2	2 Step Amplification	50*	00:15	95 °C	None
			00:40	60 °C	Reading

* — количество циклов при использовании набора реагентов РН-047 можно сократить до 45

* — количество циклов при использовании набора реагентов РН-102 можно сократить до 40

Для ОТ-ПЦР-РВ

Stage	Stage Type	Cycle	Time	Temperature	Fluorescence
1	Preincubation	1	15:00	45 °C	None
2	Preincubation	1	05:00	95 °C	None
3	2 Step Amplification	50**	00:15	95 °C	None
			00:40	60 °C	Reading

** — количество циклов при использовании наборов реагентов РН-042, РН-043, РН-045 можно сократить до 40

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-029; РН-004

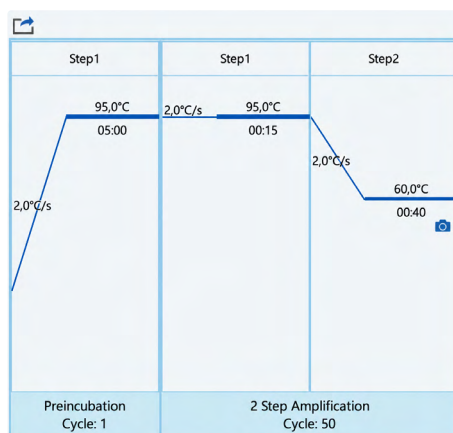
Stage	Stage Type	Cycle	Time	Temperature	Fluorescence
1	Preincubation	1	05:00	95 °C	None
2	2 Step Amplification	50	00:15	95 °C	None
			00:40	62 °C	Reading

Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-100м

Stage	Stage Type	Cycle	Time	Temperature	Fluorescence
1	Preincubation	1	05:00	95 °C	None
2	2 Step Amplification	45	00:15	95 °C	None
			00:40	53 °C	Reading

Для ПЦР-РВ наборов реагентов РН-055; РН-062

Stage	Stage Type	Cycle	Time	Temperature	Fluorescence
1	Preincubation	1	05:00	95 °C	None
2	2 Step Amplification	50	00:15	95 °C	None
			00:40	64 °C	Reading



Пример заданной программы амплификации

- Во вкладке Experiment выставить объем реакционной смеси **25 мкл (Reaction Volume 25μL)**.
- Перейти во вкладку **Sample Setting**.
- Обозначить на плашке месторасположение образцов:
 - Первая лунка — **ПКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ПКО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Positive**.
 - Вторая лунка — **ОКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ОКО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Negative**.
 - Следующая лунка — исследуемый образец 1, затем — исследуемый образец 2 и т.д. в соответствии с пунктом 4 «Подготовка к проведению ПЦР-РВ. Жидкие реакционные смеси».

Run Setting		Sample Setting	Run Monitoring	
All	1	2	3	
A	POS			
	FAM HEX ROX Cy5			
B	NEG			
	FAM HEX ROX Cy5			
C	1			
	FAM HEX ROX Cy5			
D	2			
	FAM HEX ROX Cy5			
E	oko-y			
	FAM HEX ROX Cy5			

Property	
Select Test:	
Sample Type:	Positive
Sample:	
Dye:	Gene:
☒ FAM	
☒ HEX	
☒ ROX	
☒ Cy5	
☐ Alexa Fluor 680	
☐ FRET	

- Поместить пробирки в амплификатор в рекомендуемом порядке. Для этого выделить все оставшиеся лунки, в которых находятся пробирки с образцами, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Unknown**.

10. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям. Для этого выделить на планшете лунки со всеми исследуемыми пробирками (включая ПКО и ОКО) и поставить галочки в колонке **Dye** на красителях согласно **Таблице 1**.

11. Перейти во вкладку **Run** и в открывшемся окне нажать **Run**.

12. По завершении ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Процедура измерения результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью программного обеспечения приборов для ПЦР-РВ, например «АНК-32 (32М, 48)», CFX96 или эквивалентных им (см. п. «Рекомендуемое измерительное оборудование»).

Критерием регистрации роста сигнала флуоресценции (наличия кинетической кривой роста сигнала флуоресценции) в программном обеспечении приборов является величина порогового цикла C_t , которая соответствует любому значению менее 50.

Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается программным обеспечением, например, как предельное значение порогового цикла ($C_t \geq 50$ в приборах «АНК») либо как его отсутствие (N/A в приборах фирмы «Bio-Rad») и т. п.

Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Интерпретация результатов

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с используемым прибором и набором реагентов.

Порядок оценки результатов для приборов RotorGene6000/RotorGeneQ

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе «Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7».
2. Нажать в меню программы «Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7» клавишу «Analysis/Анализ», выбрать закладку «Quantitation/Количественный».
3. Выбрать строку с целевым красителем и нажать клавишу «Show/Показать». В открывшемся окне появятся кинетические кривые в логарифмической шкале.
4. В меню окна «Quantitation Analysis/Количественный анализ» активировать: «Linear Scale/Линейная шкала», «Dynamic Tube/Динамич. фон», «Outlier Removal/Устранение выбросов» – 10% «Slope Correct/Коррект. уклона».

Примечание: при выполнении операции «Коррекция уклона» необходимо следить, чтобы не происходило кардинальных изменений в рисунке кинетических кривых (например, кривые без подъема флуоресценции после «коррекции уклона» преобразуются в линии с положительной динамикой флуоресценции и углом наклона). Если в результате проведения данной операции происходят кардинальные изменения в рисунке кинетических кривых, то операцию «Коррекция уклона» можно проводить ТОЛЬКО для образцов с подъемом флуоресценции в данном канале, т.е. ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ по данному каналу! В меню «CT Calculation/Вычисление CT» установить значение для пороговой линии «Threshold/Порог» – 0,05 и «Eliminate cycles before/Исключить циклы до» – 5.

Примечание: если не удастся установить значение порога на уровне 0,05 из-за фоновых флуктуаций флуоресценции отдельных кривых, то можно поднять значение пороговой линии до диапазона 0,05-0,1.

5. Провести интерпретацию результатов, как описано в инструкции к набору реагентов в разделе **Интерпретация результатов анализа** (п. 7.6).

Обработка результатов для прибора CFX96

1. Открыть файл в программе «Bio-Rad CFX Manager/ Bio-Rad CFX Maestro». Для этого в меню **File/Файл** выбрать **Open/Открыть Data File/Файл данных**, найти обрабатываемый файл и открыть его.
2. Установить расчет результатов анализа методом **Regression/Перпессия**. Для этого в меню **Settings/Настройки** выбрать **Cq Determination Mode/ Режим определения Cq Regression/Перпессия**.
3. Провести интерпретацию результатов, как описано в инструкции к набору реагентов в разделе **Интерпретация результатов анализа** (п. 7.6).

Обработка результатов ПЦР-РВ для приборов ДТпрайм/ДТлайт

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе «RealTime_PCR».
2. Перед оценкой результатов необходимо установить следующие настройки:
 - Тип анализа: **Мультиплекс**
 - Метод: **Геометрический**
 - Выбрать оптический канал 
 - В правом нижнем углу открыть «Режимы просмотра данных»; выбрать «Режим Fam/Hex/Rox/Cy5»
 - При необходимости, выбрать «Изменить масштаб одного из каналов». Выставить для FAM масштаб от 30 до 50%.
 - Под графиками нажать Автошкалу для выравнивания 
 - В Таблице справа выбрать в закладке «Результаты» «Мультиплекс»
3. Провести интерпретацию результатов, как описано в разделе **Интерпретация результатов анализа**.

Обработка результатов для приборов АНК-32 (32М, 48)

- 1. По окончании исследования завершить работу в соответствии с инструкцией к прибору.
- 2. В программе «ANK Shell» нажать «Просмотр файлов данных» и открыть файл с результатами исследования, выбрав его в папке соответствующего прибора.
- 3. Провести интерпретацию результатов, как описано в инструкции к набору реагентов в разделе Интерпретация результатов анализа (п. 7.6).

Обработка результатов ПЦР-РВ для прибора QuantStudio5

- 1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе «QuantStudio Designs & Analysis Software» или «Design and Analysis».
- 2. Преобразовать кинетические кривые в линейную шкалу. Для этого нажать на иконку. В появившемся окне выбрать Тип графика – Линейный (Graph Type – Linear).
- 3. Преобразовать полученные данные в необходимый формат с помощью специального шаблона Excel для QuantStudio5, актуален в случае обработки результатов в программе «QuantStudio™ Design & Analysis Software» (доступен на сайте ООО «НПФ Синтол», пароль для .rar Syntol42! <http://www.syntol.ru/>).

Обработка результатов для прибора Gentier 96E/R

- 1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе Real-time PCR System.
- 2. Перейти во вкладку Analysis и провести интерпретацию результатов, как описано в инструкции в разделе Интерпретация результатов анализа (п. 7.6).

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице.			
Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу (Таблица 1)		Образец	Интерпретация
Специфичная реакция	ВПК		
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев			
Отсутствие сигнала флуоресценции	Наличие сигнала флуоресценции	ПКО	Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
Отсутствие сигнала флуоресценции	Отсутствие сигнала флуоресценции	ОКО, ОКО-В	Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
Наличие сигнала флуоресценции	Наличие сигнала флуоресценции	ОКО-В	Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения НК
		ОКО	Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы			
Отсутствие сигнала флуоресценции	Отсутствие сигнала флуоресценции	Проба	Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов			
Наличие сигнала флуоресценции	Наличие сигнала флуоресценции	ПКО	Набор реагентов специфичен в отношении исследуемого патогена
Отсутствие сигнала флуоресценции	Наличие сигнала флуоресценции	ОКО-В ОКО	Контаминация и ингибирование отсутствуют
Отсутствие сигнала флуоресценции	Наличие сигнала флуоресценции	Проба	В пробе не обнаружены НК исследуемого патогена
Наличие сигнала флуоресценции ≤40 циклу	Наличие/отсутствие сигнала флуоресценции	Проба	В пробе обнаружена НК исследуемого патогена

Проведение поэтапной интерпретации результатов

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе для анализа результатов ПЦР-РВ или ОТ-ПЦР-РВ.

2. Оценить рост сигнала флуоресценции по каналу внутреннего положительного контроля (ВПК) для всех образцов. Реакция ВПК должна проходить в отрицательных контролях, положительном контроле и каждом образце. Если по каналу ВПК отсутствует сигнал флуоресценции, результаты по соответствующей пробе следует считать недостоверными из-за возможного ингибирования ПЦР. Исключение составляют случаи, описанные ниже в разделе **Вирусы и Вироиды**, когда высокая концентрация вируса может ингибировать реакцию ВПК.

В случае ингибирования ВПК следует проверить чистоту выделенного образца и при необходимости повторить все этапы, начиная с пробоподготовки и выделения. До получения корректного сигнала ВПК результаты по целевому каналу фитопатогена не подлежат анализу.

3. Подтвердить отсутствие сигнала флуоресценции по каналу целевой реакции у образца ОКО (отрицательный контрольный образец) и образца ОКО-В (отрицательный контрольный образец выделения). Наличие сигнала по каналу целевой реакции в ОКО свидетельствует о контаминации в зоне приготовления реакционных смесей или зоне проведения ПЦР-анализа. Наличие сигнала по каналу целевой реакции в ОКО-В свидетельствует о контаминации в зоне выделения нуклеиновых кислот.

При контаминации в ОКО-В требуется провести уборку лабораторных помещений с использованием хлорсодержащих средств, заменить набор для выделения нуклеиновых кислот на новый; при необходимости выполнить взятие смывов до и после уборки, затем повторить все этапы диагностики начиная с пробоподготовки и выделения.

При наличии сигнала целевой реакции в ОКО и его отсутствии в ОКО-В необходимо начать с постановки ПЦР при необходимости заменив набор реагентов для ПЦР-РВ новым. При контаминации рабочих поверхностей в зоне приготовления реакционных смесей следует провести уборку лабораторного помещения хлорсодержащими средствами, при необходимости выполнить взятие смывов до и после уборки.

При контаминации ОКО и ОКО-В необходимо провести деконтаминацию рабочих помещений и повторить все этапы диагностики, начиная с выделения нуклеиновых кислот, используя при этом новые наборы реагентов.

4. Подтвердить рост сигнала флуоресценции по каналу целевой реакции у ПКО (положительный контрольный образец). Отсутствие сигнала у ПКО может свидетельствовать о ряде технических проблем: деградация компонентов тест-системы или деградация ПКО (проверить срок годности набора), ошибка оператора на этапе подготовки смеси или при внесении ПКО и т.д.

При отсутствии сигнала флуоресценции целевой реакции у ПКО результаты всего раунда ПЦР следует считать недостоверными. В таком случае необходимо повторно провести постановку, предварительно убедившись в корректности приготовления реакционной смеси, работоспособности реагентов и соблюдении условий хранения.

5. Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналу целевой реакции в исследуемом образце свидетельствует о наличии в пробе целевого фрагмента НК.

Примечание: на данном этапе необходимо учитывать особенности интерпретации в зависимости от объекта диагностики.

Особенности интерпретации в зависимости от объекта диагностики

Вирусы и вириоды.

Отличительной особенностью биологии вирусных и вириодных фитопатогенов является их высокая плотность в зараженных тканях растений по сравнению с грибными или бактериальными фитопатогенами, что позволяет получать высокую концентрацию матриц при экстракции нуклеиновых кислот. В результате этого при проведении ПЦР-РВ наблюдается ранний выход кривых флуоресценции (6-20 Ct), который иногда сопровождается ингибированием ВПК. Подобное явление называется «**эффектом конкурентного ингибирования**». При экстремально высокой концентрации целевого фитопатогена у внутреннего положительного контроля может отсутствовать сигнал флуоресценции или регистрироваться на очень поздних циклах из-за истощения компонентов реакционной смеси. Подобные образцы однозначно можно отнести к положительным, однако ввиду высокой концентрации они могут служить источником контаминации.

Если в рамках одного эксперимента выявлены подобные сильно зараженные образцы, их признают положительными, а остальные образцы с ростом сигнала флуоресценции на более поздних циклах (Ct >25), необходимо перепроверить (Рисунок 2).

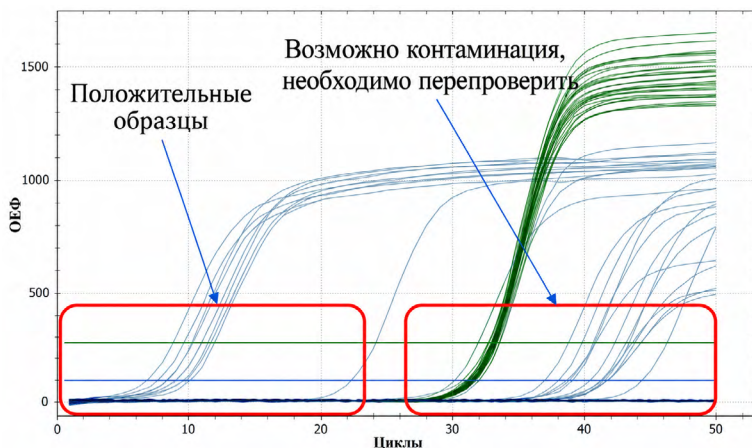


Рисунок 2 – Пример контаминации при выявлении сильно зараженных образцов при диагностике вируса коричневой морщинистости томата (ToBRFV).

Повторную диагностику оставшихся образцов необходимо начать с этапа выделения нуклеиновых кислот, используя новые наборы реагентов для выделения НК и ОТ-ПЦР-РВ. Если при повторном исследовании результаты для образцов подтверждаются, их можно считать положительными.

Примечание: при анализе на карантинные фитопатогены положительный результат следует подтверждать с использованием второго метода (ИФА, ИХА, секвенирование по Сэнгеру, NGS и др.) или набором другого производителя.

В случае если в постановке не было сильно зараженных образцов, но есть образцы, которые выхоят после 30 цикла, то для них также необходимо подтвердить положительный результат с использованием другого метода или набором другого производителя.

Бактериальные патогены.

При интерпретации результатов, полученных при выявлении бактериальных патогенов методом ПЦР в реальном времени, необходимо учитывать ряд особенностей. В отличие от вирусов и вириоидов, бактерии в растительном материале часто присутствуют в меньшей концентрации, поэтому степень выявления может зависеть от качества выделенной ДНК, наличия ингибиторов и степени засорённости образцов. Для бактериальных фитопатогенов характерно позднее появление сигнала флуоресценции. Анализуются результаты до 40-го цикла, то есть положительными следует считать только те образцы, амплификация в которых соответствует критериям, установленным методикой (Ct<40).

При получении неинтерпретируемых, сомнительных или слабopоложительных результатов рекомендуется провести подраживание бактерий на питательной среде (в чашке Петри или в колбе с PBS-буфером)* для увеличения концентрации бактериальной массы, после этапа концентрирования необходимо повторить анализ, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот, с соблюдением всех требований к организации рабочего процесса. При необходимости выполнить дополнительную очистку элюата или развести полученные образцы в ТЕ-буфере (1X), ddH₂O или ОКО из набора реагентов для ПЦР-РВ. Данные действия позволяют снизить или исключить воздействие ингибиторов на прохождение ПЦР-РВ. Как правило, достаточно разведения образца в 2–4 раза, большее разведение способно сильно сместить целевую реакцию в сторону поздних значений циклов. Также для слабopоложительных или сомнительных проб рекомендуется использовать двукратную повторность при постановке ПЦР-РВ, что позволит избежать ложноположительных результатов и подтвердить наличие патогена.

Примечание: при анализе на карантинные фитопатогены положительный результат следует подтверждать с использованием второго метода (ИФА, ИХА, секвенирование по Сэнгеру, NGS и др.) или набором другого производителя.

Грибные патогены.

При интерпретации результатов, полученных при выявлении грибных фитопатогенов методом ПЦР в реальном времени, необходимо учитывать ряд особенностей. В отличие от вирусов и вириоидов, грибы, аналогично бактериям, часто присутствуют в растительном материале в меньшей концентрации, поэтому степень выявления может зависеть от качества выделенной ДНК, наличия ингибиторов и степени засорённости образцов. Для грибных фитопатогенов характерно позднее появление сигнала флуоресценции. Анализуются результаты с Ct <40, однако положительными следует считать только те образцы, амплификация в которых соответствует критериям, установленным методикой.

При получении неинтерпретируемых, сомнительных или слабopоложительных результатов рекомендуется повторить анализ, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот, с соблюдением всех требований к организации рабочего процесса. При необходимости выполнить дополнительную очистку элюата или развести полученные образцы в ТЕ-буфере (1X), ddH₂O или ОКО из набора реагентов для ПЦР-РВ. Данные действия позволяют снизить или исключить воздействие ингибиторов на прохождение ПЦР-РВ. Как правило, достаточно разведения образца в 2–4 раза, большее разведение способно сильно сместить целевую реакцию в сторону поздних значений циклов.

Примечание: при анализе на карантинные фитопатогены положительный результат следует подтверждать с использованием второго метода (ИФА, ИХА, секвенирование по Сэнгеру, NGS и др.) или набором другого производителя.

* Диагностические протоколы ЕОКЗР. Международные стандарты по фитосанитарным мерам 27 Приложение 13. Диагностический протокол: *Erwinia amylovora* (2016), МККЗР, ФАО

Возможные проблемы и решения

Возможные проблемы	Решение
Наличие роста сигнала флуоресценции по каналам специфической реакции у образцов ОКО и/или ОКО-В	Контаминация в лаборатории. • Если наличие сигнала флуоресценции наблюдается только в образцах ОКО-В, значит контаминация в зоне выделения НК и/или пробоподготовки. Необходимо провести уборку помещения с хлорсодержащими моющими средствами и повторить эксперимент, используя новый набор для выделения НК. • Если наличие сигнала флуоресценции наблюдается только в образцах ОКО, значит контаминация в зоне раскапывания реакционных смесей. Необходимо провести уборку помещения с хлорсодержащими моющими средствами и повторить эксперимент, используя новый набор для проведения ПЦР-РВ. • Если наличие сигнала флуоресценции наблюдается в образцах ОКО и ОКО-В, значит контаминация всей лаборатории. Необходимо провести уборку помещения с хлорсодержащими моющими средствами и повторить эксперимент, используя новый набор для выделения НК и новый набор для ПЦР-РВ. • В случае повторной регистрации сигнала флуоресценции у образцов ОКО и/или ОКО-В необходимо провести взятие смывов с рабочих поверхностей для определения источника загрязнения и провести уборку помещений с хлорсодержащими моющими средствами. После данных процедур необходимо провести повторное взятие смывов. При получении отрицательного результата, а именно отсутствия контаминации, можно приступать к проведению экспериментов
Отсутствие роста сигнала флуоресценции по каналам специфической реакции у образцов ПКО	Необходимо повторить эксперимент, удостоверившись в правильности проведения анализа: • Проверить, что добавлены все реактивы согласно инструкции. • Проверить правильность программы амплификации. • Проверить, правильно ли указаны каналы детекции флуоресценции (Таблица 1). • Проверить срок годности используемых реактивов
Отсутствие сигнала флуоресценции по каналам внутреннего положительного контроля (ВПК) у образцов ПКО, ОКО, ОКО-В	
Отсутствие сигнала флуоресценции по каналам внутреннего положительного контроля (ВПК) у исследуемых образцов (при условии наличия сигнала у контрольных образцов)	1. Возможная ситуация: отсутствие сигнала флуоресценции по каналам ВПК у исследуемых образцов с одновременным наличием сигнала флуоресценции по ВСЕМ каналам специфической реакции. При такой ситуации результаты эксперимента считают достоверными. 2. Возможная ситуация: отсутствие сигнала флуоресценции по каналам ВПК у исследуемых образцов с одновременным отсутствием сигнала флуоресценции по любому из каналов специфической реакции. При такой ситуации результаты эксперимента считают недостоверными. Такой вариант происходит при сильном ингибировании реакции; рекомендуем развести образец/образцы в 10 раз и повторить эксперимент.

Возможные проблемы	Решение
Начало роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции на 2–5 цикле	При регрессионном анализе появляются кривые флуоресценции с некорректной формой (не S-образные) на 2–5 циклах. Причина такого результата — особенности работы оптической системы прибора и алгоритмов подсчёта данных. При возникновении подобной ситуации рекомендуем проводить анализ с использованием пороговой линии.
Сигнал флуоресценции по каналам специфичной реакции присутствует у всех образцов и совпадает с пороговыми циклами внутреннего положительного контроля	Указанная ситуация возможна при использовании некоторых приборов с некорректно настроенной детекцией флуоресценции. Такой результат возникает при переносе флуоресценции с одного канала на другой («пересвет» каналов). Рекомендуем провести эксперимент на другом приборе.
Начало роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции наблюдается на 40+ циклах	1. При диагностике вирусных инфекций: поздние циклы не характерны для вирусов. При отсутствии роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции у образцов ОКО и ОКО-В рекомендуем повторить исследование, начиная с этапа выделения НК. Последующую ОТ-ПЦР-РВ рекомендуем провести в двойном повторе. При повторении полученного ранее результата рекомендуем сократить программу амплификации до 40 циклов. 2. При диагностике бактериальной инфекции: при отсутствии роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции у образцов ОКО и ОКО-В рекомендуем повторить исследование, начиная с этапа выделения НК с использованием метода подрачивания бактерий. Последующую ПЦР-РВ рекомендуем провести в двойном повторе. 3. При диагностике грибной инфекции: при отсутствии роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции у образцов ОКО и ОКО-В рекомендуем повторить исследование, начиная с этапа выделения НК. Последующую ПЦР-РВ рекомендуем провести в двойном повторе. При повторении полученного ранее результата рекомендуем сократить программу амплификации до 45 циклов. В случае повторного получения описанных результатов даже при использовании вышеуказанных рекомендаций можно направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол».

Проведение внутрилабораторной валидации наборов (тест-систем)

Внутрилабораторная валидация наборов реагентов (тест-систем) для выявления нуклеиновых кислот патогенов растений проводится и оценивается по следующим аналитическим характеристикам:

- Аналитическая специфичность
- Аналитическая чувствительность
- Аналитическая повторяемость
- Аналитическая воспроизводимость

Аналитическая специфичность – способность тест-системы выявлять только целевую нуклеиновую кислоту патогена, исключая кросс-реакцию с генетическим материалом другого патогена.

Для определения аналитической специфичности валидируемого набора реагентов рекомендуется использовать выборку близкородственных и сопутствующих организмов, поражающих основное растение-хозяин. Оценка полученных результатов проведенного анализа проводят по следующим критериям:

Результаты анализа не подлежат учету:

- В случае отсутствия регистрации роста сигнала ОКО и ОКО-В по каналу внутреннего положительного контроля (ВПК) (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- В случае регистрации роста сигнала ОКО (ОКО-В) по каналу специфичной реакции (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.
- В случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу внутреннего положительного контроля одновременно с отсутствием сигнала по каналу специфичной реакции (ложноотрицательный результат в конкретной пробирке);
- В случае отсутствия регистрации роста сигнала ПКО по каналу специфичной реакции (ложноотрицательный результат всего эксперимента).

Результаты анализа подлежат учету:

- В случае отсутствия роста сигнала флуоресценции ОКО (ОКО-В) по каналам специфичной реакции одновременно с регистрацией роста сигнала по каналу внутреннего положительного контроля;
- В случае регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу внутреннего положительного контроля одновременно с отсутствием сигнала по каналу специфичной реакции;
- В случае регистрации роста сигнала ПКО по каналам специфичной реакции.

При получении результатов, соответствующих вышеописанным критериям, оценка аналитической специфичности дается следующим образом:

- Наличие роста сигнала флуоресценции в пробирках с НК целевого патогена и отсутствие сигнала флуоресценции в пробирках с НК близкородственными и сопутствующими организмами (Тестируемый набор (тест-система) специфичен: выявляет только нуклеиновую кислоту целевого патогена).
- Наличие роста сигнала флуоресценции в пробирках с НК целевого патогена и наличие сигнала флуоресценции в пробирках с НК близкородственными и сопутствующими организмами (Тестируемый набор не специфичен: выявляет нуклеиновую кислоту как целевого, так и близкородственных патогенов).

Пример: проверка набора реагентов «*Tomato brown rugose fruit virus-PB*» проводится с использованием коллекции следующих вирусов:

- *Tobamovirus fructirugosum* (Tomato brown rugose fruit virus – ToBRFV),
- *Nepovirus lycopersici* (Tomato ringspot virus – ToRSV),
- Potato yellowing virus (PYV),
- Tomato chocolate virus (ToChV),

- *Tombusvirus lycopersici* (Tomato bushy stunt virus – TBSV),
- *Potexvirus ecspotati* (Potato virus X – PVX),
- *Potyvirus trumpetae* (Datura Colombian virus – CDV),
- *Tobamovirus maculatussellati* (Tobamovirus maculatussellati – ToMMV),
- *Potexvirus pepini* (Pepino mosaic virus – PepMV),
- *Orthotospovirus tomatomaculae* (Tomato spotted wilt virus – TSWV).

Приготовление реакционной смеси и постановку ОТ-ПЦР-ПВ проводят в соответствии с инструкцией к тестируемому набору. Исследуемые образцы рекомендуется тестировать в двойном повторе:

Ряд 1							
ПКО	ОКО	ToBRFV	ToBRFV	ToRSV	ToRSV	PYV	PYV
Ряд 2							
ToChV	ToChV	TBSV	TBSV	PVX	PVX	CDV	CDV
Ряд 3							
ToMMV	ToMMV	PepMV	PepMV	TSWV	TSWV	-	-

Рост кривой флуоресценции по каналу специфичной реакции – **FAM** должен наблюдаться только у образца *Tobamovirus fructirugosum* (ToBRFV). Рост кривых флуоресценции по каналу ВПК (**R6G/HEX/Yellow/VIC**) должен наблюдаться у всех образцов.

Примечание: не использовать сильно зараженные образцы целевого патогена (≈6–16 цикл) при проведении данного анализа, т.к. увеличивается риск контаминации остальных образцов и получение ложноположительного результата. Оптимальный цикл целевого патогена ≈22–26.

Аналитическая чувствительность — наименьшее содержание копий целевой НК, которое может быть определено с использованием тестируемого набора реагентов (тест-системы).

Для определения аналитической чувствительности набора реагентов проводят серию десятикратных разведений целевой плазмидной ДНК с известной концентрацией. Плазмидная ДНК может быть заменена на ПКО, входящий в состав набора, или ДНК/РНК заведомо положительного образца средней зараженности (≈18–24 цикл).

Серию десятикратных разведений проводят по следующей схеме:

- Подготовить 4 чистые пробирки объемом 1,5–2 мл (типа Eppendorf).
- В подготовленные пробирки внести по 45 мкл однократного (1X) ТЕ-буфера или ddH₂O. (Неиспользуемые во время приготовления разведений пробирки следует держать закрытыми во избежание контаминации).
- В первую пробирку внести 5 мкл плазмиды или ДНК/РНК заведомо положительного образца целевого патогена или ПКО, входящий в состав набора. Интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе, кратковременно центрифугировать для сброса капель. (Полученный образец соответствует разведению в 10 раз или 10⁻¹)
- Во вторую пробирку внести 5 мкл полученного образца из первой пробирки. Интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе, кратковременно центрифугировать для сброса капель. (Соответствует разведению в 100 раз или 10⁻²)
- В третью пробирку внести 5 мкл образца из второй пробирки. Интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе, кратковременно центрифугировать для сброса капель. (Соответствует разведению в 1 000 раз или 10⁻³)
- В четвертую пробирку внести 5 мкл образца из третьей пробирки. Интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе кратковременно центрифугировать для сброса капель. (Соответствует разведению в 10 000 раз или 10⁻⁴)

После подготовки серии десятикратных разведений приготовить реакционную смесь в соответствии

с пунктом 7.1 инструкции к набору реагентов из расчёта на 13-14 реакций (10 положительных образцов, 2 образца ОКО, 1-2 образца запасные, для исключения ошибки дозатора). Полученную реакционную смесь перемешать, кратковременно центрифугировать и разлить по 20 мкл в пробирки объемом 0,2 мл или планшеты для ПЦР.

В пробирки отрицательного контроля внести по 5 мкл ОКО, затем в пробирки исследуемых образцов – по 5 мкл НК.

Вносить образцы необходимо начиная с менее концентрированных (10^{-4}) и заканчивая исходной матрицей.

Ряд 1							
Исходная матрица	Исходная матрица	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}
Ряд 2							
10^{-4}	10^{-4}	ОКО	ОКО	-	-	-	-

После внесения образца крышку пробирки следует сразу же закрыть. Закрытые стрипы центрифугировать для сброса капель. Исключить наличие пузырьков в пробирках. Провести амплификацию согласно инструкции к набору реагентов.

Полученные результаты оцениваются по следующим критериям:

- Рост кривой флуоресценции по каналу целевой реакции наблюдается в двух повторностях разведения – стабильная реакция.
- Рост кривой флуоресценции по каналу целевой реакции наблюдается в одной повторности разведения – нестабильная реакция.
- Рост кривой флуоресценции по каналу целевой реакции не наблюдается ни в одной из повторностей – реакция отсутствует.

Аналитическая чувствительность тест-системы соответствует последнему десятикратному разведению образца средней зараженности, в котором реакция проходит стабильно.

Аналитическая повторяемость — признак, характеризующий минимальную вариабельность результатов анализа, полученных в одинаковых условиях (одна и та же проба, лаборатория, прибор).

Для определения аналитической повторяемости набора реагентов проводится постановка ПЦР-РВ или ОТ-ПЦР-РВ с ДНК/РНК заведомо положительного образца (целевой патоген из коллекции) или положительного образца из тестируемого набора (ПКО) в десятикратной повторности по следующей схеме:

Приготовить реакционную смесь в соответствии с пунктом 7.1 инструкции к набору реагентов из расчёта на 13-14 реакций (10 положительных образцов, 2 образца ОКО, 1-2 образца запасные, для исключения ошибки дозатора). Полученную реакционную смесь перемешать, кратковременно центрифугировать и разлить по 20 мкл в пробирки объемом 0,2 мл или планшеты для ПЦР.

В пробирки отрицательного контроля внести по 5 мкл ОКО, затем в пробирки исследуемых образцов – по 5 мкл НК. Закрыть пробирки, центрифугировать для сброса капель. Исключить наличие пузырьков в пробирках.

Ряд 1							
Образец	Образец	Образец	Образец	Образец	Образец	Образец	Образец
Ряд 2							
Образец	Образец	ОКО	ОКО	-	-	-	-

Провести амплификацию по циклограмме, указанной в инструкции к набору реагентов.

При анализе Аналитической повторяемости, отклонение значений порогового цикла по каналу целевой реакции не должно превышать $\pm 0,3/0,4$ цикла от среднего при условии использования одного и того же амплификатора.

Эксперимент проводится в трехкратной повторности.

Аналитическая воспроизводимость — признак, характеризующий стабильность результатов анализа в различных условиях проведения эксперимента (изменение прибора, серии реакционной смеси и фермента, ДНК/РНК, места и лабораторного оборудования, используемого для подготовки ПЦР).

Для испытания аналитической воспроизводимости набора проводится постановка ПЦР-РВ или ОТ-ПЦР-РВ с ДНК/РНК заведомо положительного образца (целевой патоген из коллекции) в десятикратной повторности на различных приборах, имеющихся в лаборатории, по следующей схеме:

Приготовить реакционную смесь в соответствии с пунктом 7.1 инструкции к набору реагентов из расчёта на 13-14 реакций (10 положительных образцов, 2 образца ОКО, 1-2 образца запасные, для исключения ошибки дозатора). Полученную реакционную смесь перемешать, кратковременно центрифугировать и разлить по 20 мкл в пробирки объемом 0,2 мл или планшеты для ПЦР.

В пробирки отрицательного контроля внести по 5 мкл ОКО, затем в пробирки исследуемых образцов — по 5 мкл НК. Закрыть пробирки, центрифугировать для сброса капель. Исключить наличие пузырьков в пробирках.

При анализе Аналитической воспроизводимости на различных приборах для ПЦР-РВ отклонение значений порогового цикла по каналу целевой реакции не должно превышать ± 3 цикла от среднего значения.

Валидацию наборов компании проводят на следующих приборах для ПЦР в реальном времени: «CFX96/CFX Opus» («BioRad», США), «Rotor Gene 6000/Rotor Gene Q» («Qiagen», США), «DTprime/DTLite» («ДНК-технология», Россия), «QuantStudio 5» («Thermo Fisher Scientific», США), Gentier 96E («Tianlong», Китай), «АНК-32/АНК-48» (ИАП РАН, Россия) или на их аналогах со схожими каналами детекции.

Рекомендации по взятию смывов

1. Обработать ПЦР-бокс хлорсодержащими дезинфицирующими средствами. Разведение средства должно проводиться строго в соответствии с инструкцией производителя или указаниями на этикетке. Необходимо тщательно смыть дезинфицирующее средство водой и дождаться полного высыхания бокса перед началом работы.
2. В чистом ПЦР-боксе раскатать по 500 мкл ddH₂O в пробирки объемом 1,5 мл. Закрыть пробирки, расставить в штатив и промаркировать по зонам смывов согласно **Таблице 2**.

Примечание: Можно использовать воду для инъекций из аптеки.

Таблица 2. Минимальный набор зон взятия смывов для выявления контаминации

№	Точка взятия смыва	Контроль
Контрольные образцы		
1	Чистая вода (пробирку не нужно открывать)	Контроль воды
2	Вода + палочка (без контакта с поверхностями)	Контроль палочки
Зона приготовления/раскапывания смесей		
3	Внутренние поверхности ПЦР-бокса	Зона приготовления ПЦР-смеси
4	Поверхности пипеток в ПЦР-боксе	Зона приготовления ПЦР-смеси
5	Штатив для пробирок в ПЦР-боксе	Зона приготовления ПЦР-смеси
6	Микроцентрифуга-встряхиватель	Зона приготовления ПЦР-смеси
7	Поверхность и ручки холодильника в зоне приготовления ПЦР-смеси	Зона приготовления ПЦР-смеси
Зона выделения НК		
8	Внутренние поверхности ламинарного бокса для выделения НК	Зона выделения
9	Поверхности пипеток в ламинарном боксе для выделения нуклеиновых кислот	Зона выделения
10	Штатив для пробирок в ламинарном боксе	Зона выделения
11	Микроцентрифуга-встряхиватель	Зона выделения
12	Термостат	Зона выделения
13	Поверхность и ручки холодильника в зоне выделения	Зона выделения
14	Поверхность стола (ламинара) в зоне пробоподготовки	Зона пробоподготовки
Дополнительно		
15	Поверхность внутри и снаружи амплификатора для ПЦР в реальном времени	Амплификатор
16	Поверхность внутри и снаружи высокоскоростной центрифуги	
17	Ручки входной двери в зону выделения	Зона выделения
18	Ручки входной двери в зону ПЦР	Зона приготовления ПЦР-смеси

Примечание: в таблице указано минимальное количество точек для взятия смывов, увеличение их количества позволит получить более точное представление о чистоте лабораторного помещения.

3. Подготовить стерильные ватные палочки или зонды (тупферы), контейнер для их утилизации, наполненный хлорсодержащим дезинфицирующим средством (сброс). Для каждой точки смыва использовать свою палочку или зонд.

Для получения более точных данных о внутрилабораторной контаминации и исключения ошибок взятие смывов должны проводить два сотрудника: один берёт смывы и касается исключительно пробирок с водой и палочек; другой переносит штатив с пробами, подносит сброс и открывает доступ ко всем поверхностям.

4. Порядок взятия смывов для каждой точки:

Пробирка 1. **Контроль воды** — показывает стерильность отрицательного контроля смывов, используемого при взятии смывов. **КВ** нельзя открывать до момента внесения в реакционную смесь.

Пробирка 2. **Контроль палочки** — показывает чистоту зондов или ватных палочек, используемых при взятии смывов. Для взятия **КП** необходимо открыть нужную пробирку, взять палочку и опустить в пробирку с водой на несколько секунд. Затем палочку нужно аккуратно отжать, используя стенки пробирки. Использованную палочку поместить в сброс, пробирку закрыть.

Пробирки **3–18**. Открыть пробирку, соответствующую зоне отбора смыва. Взять новую палочку, опустить в пробирку с водой на несколько секунд, затем достать. Смоченной палочкой провести по рабочей поверхности зигзагообразным движением, одновременно вращая пластиковый стержень для большего захвата материала. Старайтесь двигаться от потенциально менее загрязнённых к более загрязнённым областям, охватывая при этом труднодоступные зоны (например, лунки штативов, кнопки и ручки дозаторов). Опустить палочку в пробирку с водой, слегка надавливая отжать её о стенки. Использованную палочку поместить в сброс.

Примечание: при взятии смывов с электроприборов (центрифуги, весы, термостаты и т.д.) соблюдайте технику безопасности, предварительно обесточивайте их. Будьте аккуратны при взятии смывов с внешних и внутренних поверхностей амплификаторов для ПЦР-РВ. Несоблюдение правил влечет за собой риски повреждения оптических систем, появления царапин на световоде, залития линз (например, попадание жидкости в центральное или боковое оптическое окно приборов сериу Rotor-Gene) или механическое повреждение прижимного механизма крышки (в приборах Bio-Rad CFX96 категорически запрещено протирать верхнюю часть крышки с внутренней стороны). Подобные действия могут привести к некорректному считыванию сигнала флуоресценции, искажению результатов анализа и критической поломке прибора.

5. По завершении пробоотбора полученные смывы переносят в зону приготовления ПЦР-смесей для дальнейшей амплификации методом ПЦР-РВ. Все полученные образцы смывов вносятся напрямую в готовую реакционную смесь, минуя этап экстракции нуклеиновых кислот. Выбор тест-системы для контроля внутрилабораторной контаминации зависит от наиболее часто встречающегося положительного материала, проходящего через лабораторию, в особенности вирусного, поскольку он имеет высокий риск аэрозольного переноса. Также можно использовать наборы реагентов для обнаружения ДНК растений (Кат. № GM-101 «Растение универсал»). Для контроля контаминации следует использовать исключительно новые наборы реагентов! В анализ также необходимо включить ПКО из набора, для контроля прохождения реакции, и ОКО раскраски, для контроля чистоты используемых реактивов.

6. Интерпретация результатов:

В контрольных образцах КВ, КП не должна фиксироваться флуоресценция по каналу целевой реакции, только реакция внутреннего положительного контроля. В данном случае наличие целевой реакции может свидетельствовать о загрязнении используемой воды, пластика или палочек/зондов. Ингибирование реакции ВПК может свидетельствовать об остаточном количестве хлорсодержащих средств на рабочих поверхностях.

Наличие целевой реакции в точках смывов **3-18** говорит о контаминации в рабочей зоне соответствующей точке взятия смывов.

На основании полученных результатов принимается решение о необходимости повторной деконтаминации рабочего помещения либо о допуске персонала к штатному выполнению диагностики.

Пример диагностики растительного материала на наличие нуклеиновых кислот фитопатогенов

1. **Подготовка материала для анализа.** Навеску образцов и последующий метод выделения НК выбирают согласно инструкциям к наборам реагентов, а также рекомендациям ЕРРО и ВНИИКР.



2. **Предварительная подготовка образцов** проводится либо вручную, либо автоматически в зависимости от комплектации набора.

Автоматическая гомогенизация



Ручная гомогенизация

С применением
жидкого азота



Без применения
жидкого азота



3. **Выделение нуклеиновых кислот** проводится оптимальным набором в зависимости от рода растения и царства патогена (выбор набора указан в части 1 настоящих методических рекомендаций).



4. **Подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ/ПЦР-РВ** (согласно разделу «Проведение анализа»).



5. **Запуск приборов** проводится в соответствии с разделом «Проведение ОТ-ПЦР-РВ/ПЦР-РВ».

Все наборы реагентов апробированы на следующих приборах:

- АНК-32 (32М, 48) (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия)
- CFX-96 (Bio-Rad, США)
- Rotor Gene Q/6000 (Qiagen/Corbett, США/Австралия)
- ДТпрайм/ДТлайт («ДНК-технология», Россия)
- QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США)
- Gentier 96E (Xi'an Tianlong Technology Co., Ltd, Китай)

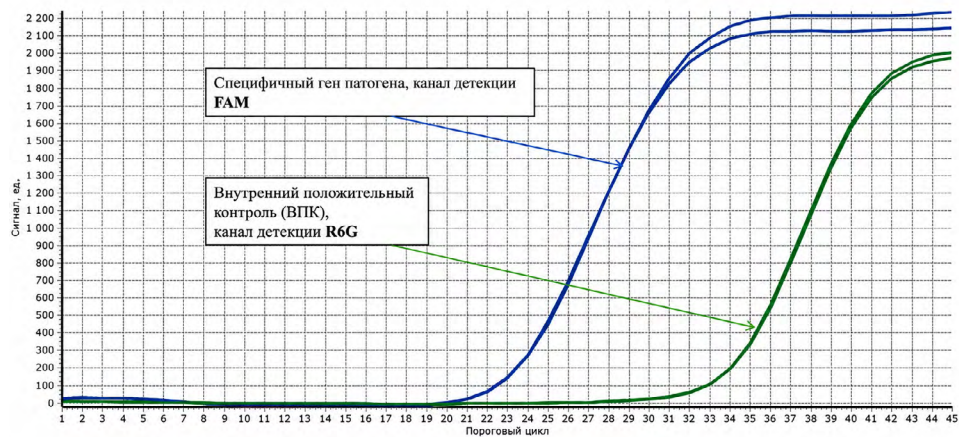
6. **Результаты** интерпретируют согласно разделу «Обработка результатов ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ».

Примеры результатов ОТ-ПЦР-РВ/ПЦР-РВ анализа на приборах разных производителей

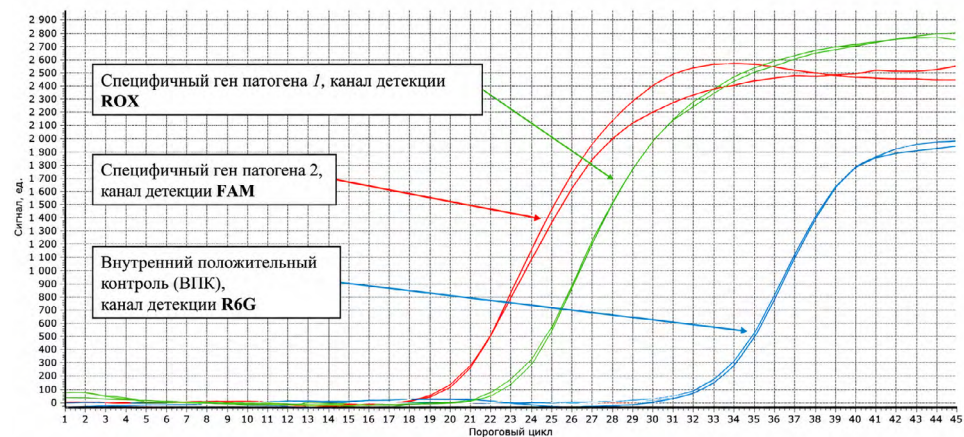
«АНК-32 (32М, 48)»

ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

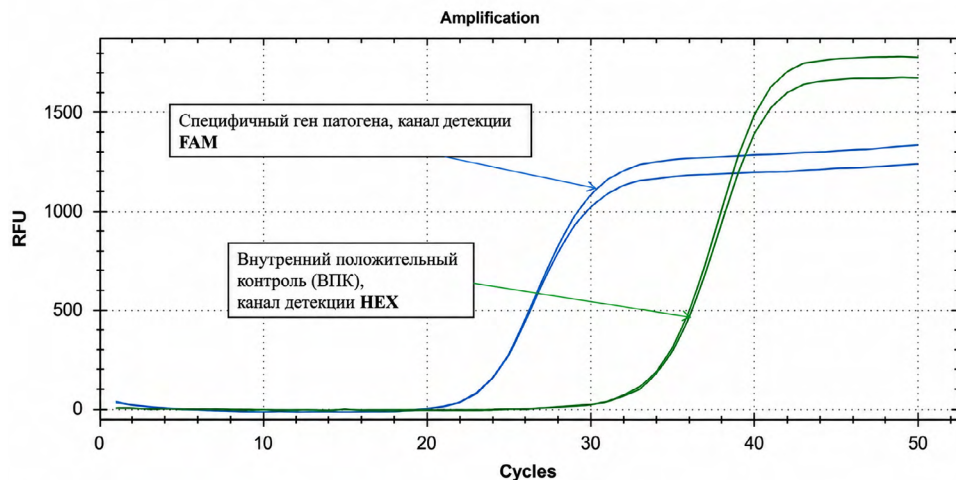
Пример двухканальной системы



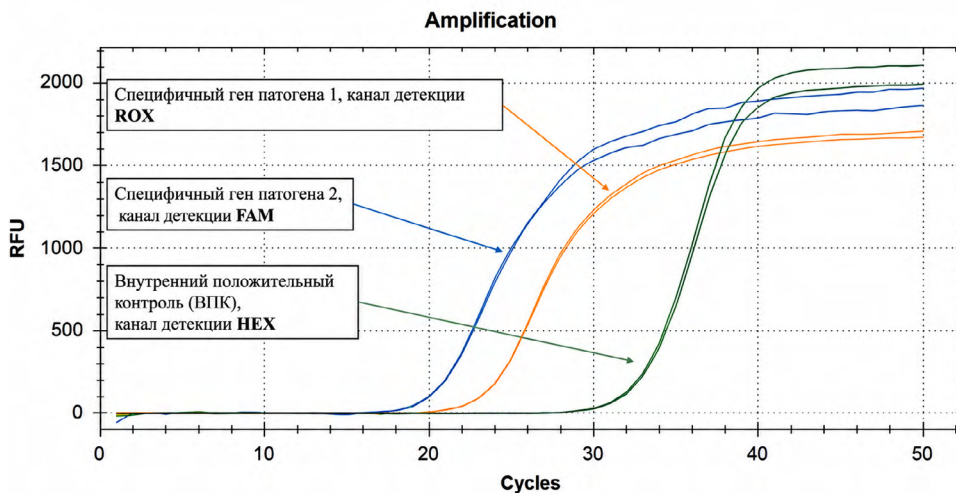
Пример трехканальной системы



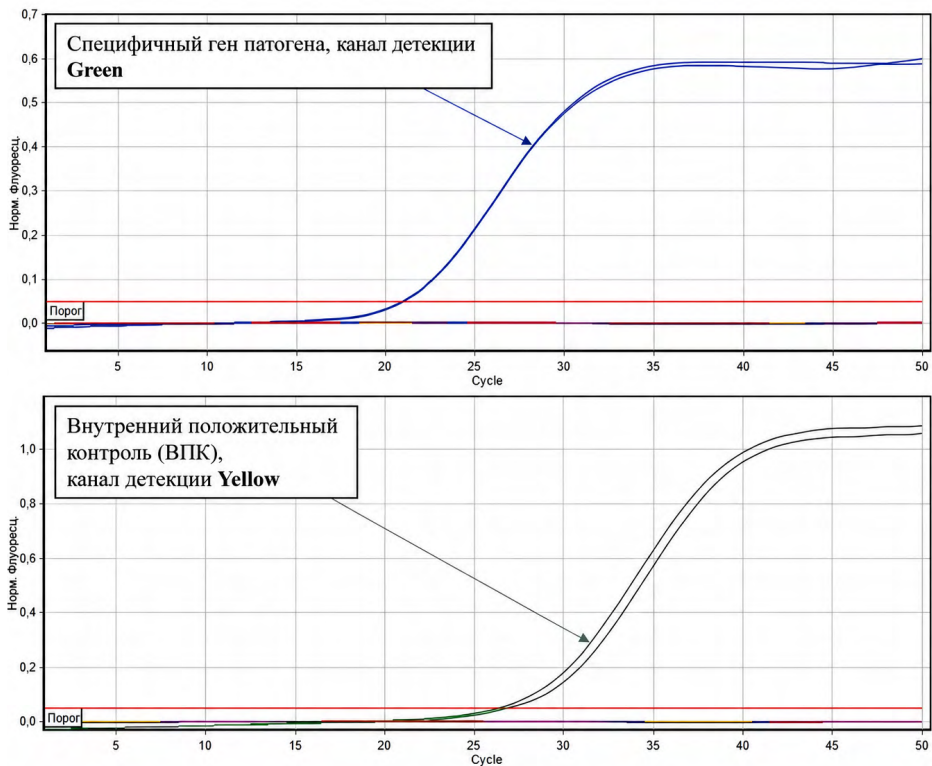
Пример двухканальной системы



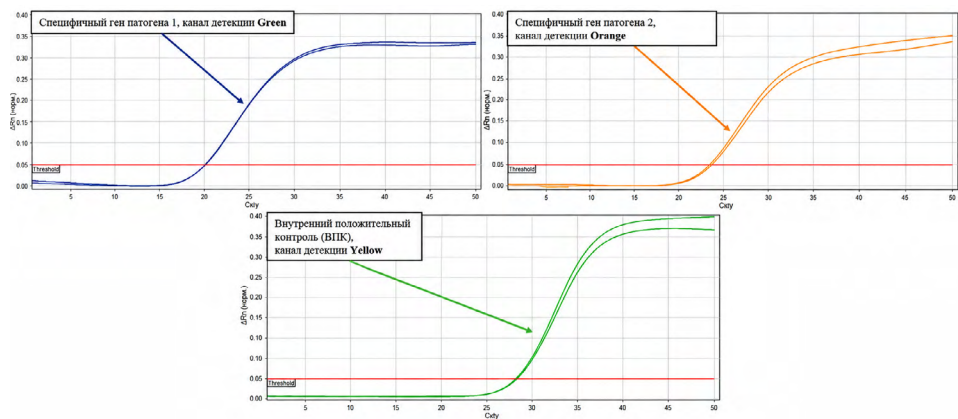
Пример трехканальной системы



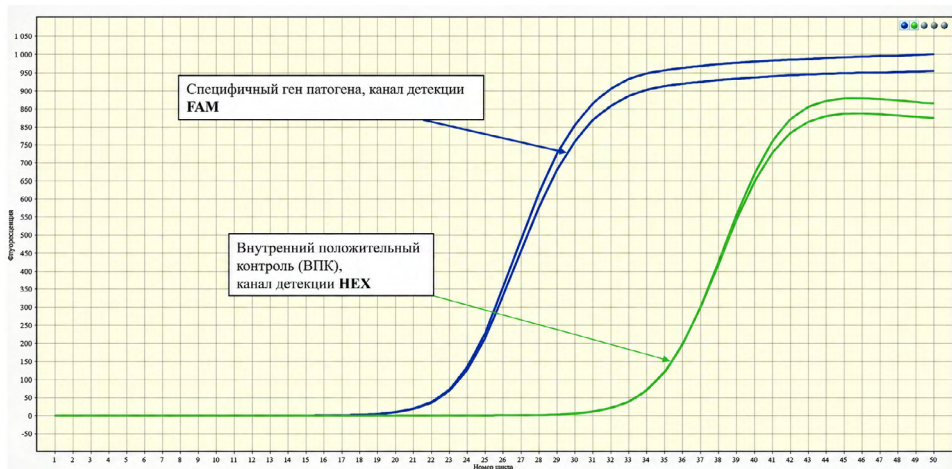
Пример двухканальной системы



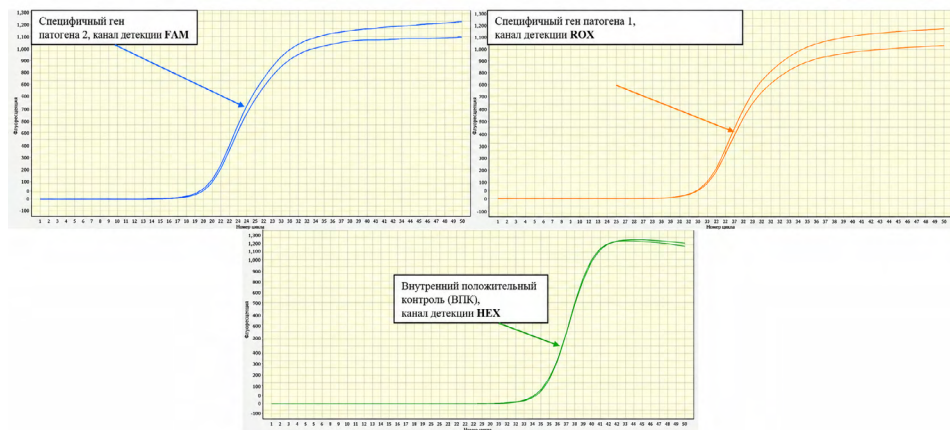
Пример трехканальной системы



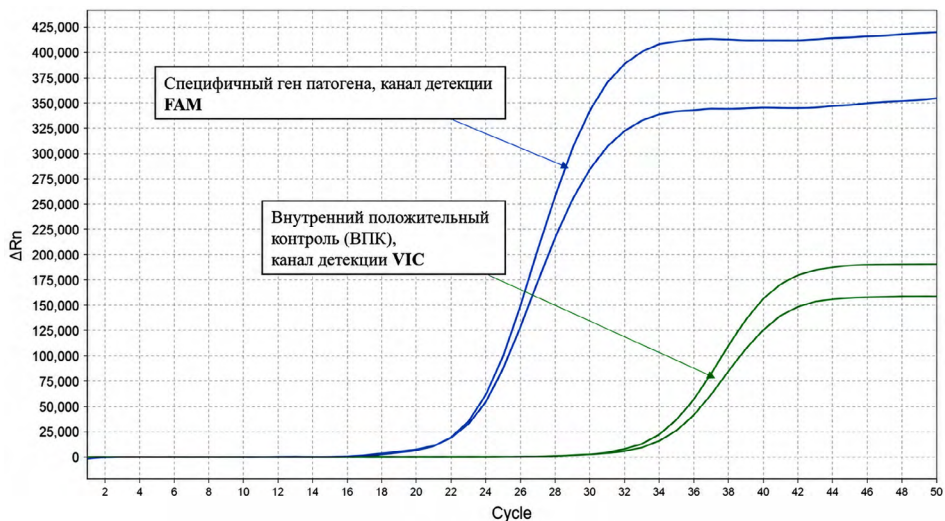
Пример двухканальной системы



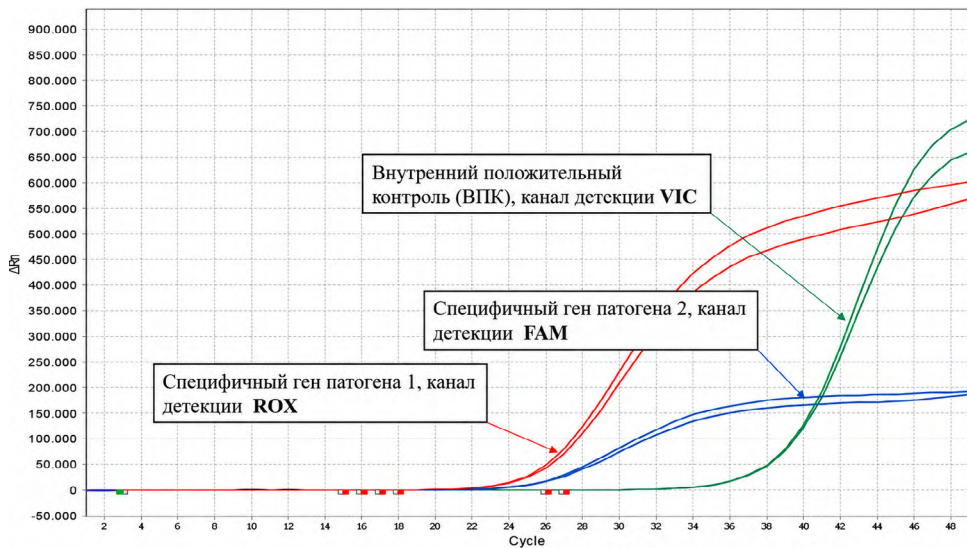
Пример трехканальной системы



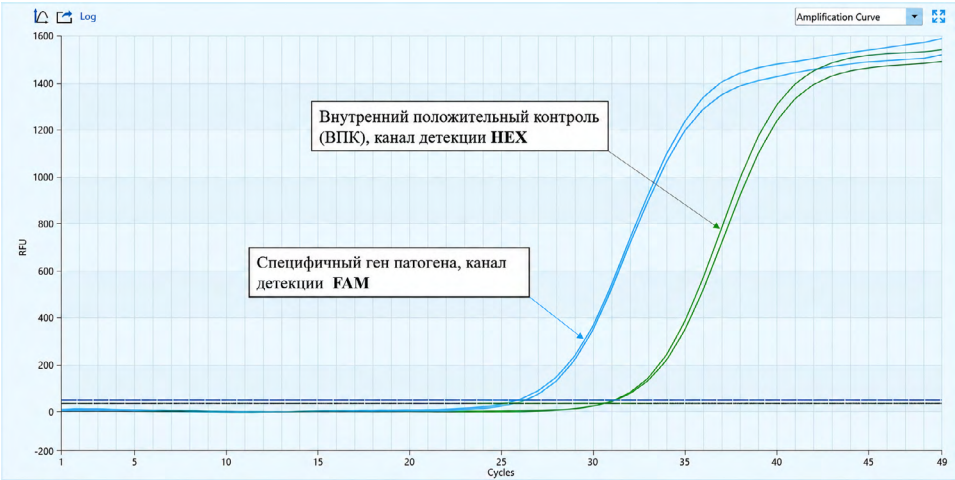
Пример двухканальной системы



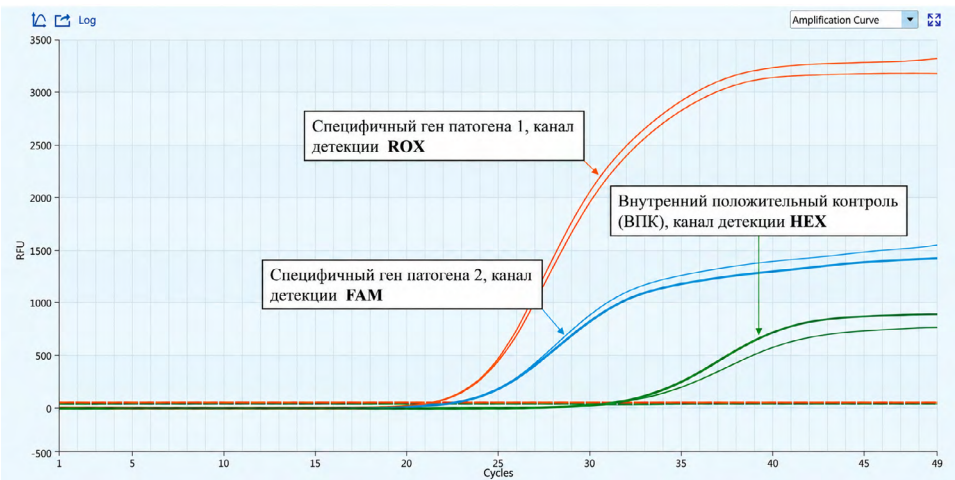
Пример трехканальной системы



Пример двухканальной системы



Пример трехканальной системы



Приложение А: Наборы реагентов для выявления фитопатогенов

Наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот

Кат. №	Название набора	Назначение набора
РН-500	Экстрагирующий буфер (PBS)	
РН-520	«Фитосорб»	Для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала (на магнитных частицах)
РН-523	«Фитосорб-П»	Для выделения НК из растительного материала с пробирками для гомогенизации (на магнитных частицах)
РН-522	«Фитосорб-Автомат-48»	Для автоматического выделения нуклеиновых кислот из растительного материала на роботизированных станциях TECAN
РН-524	«Фитоскрин-Экспресс»	Для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System и/или их аналогах
РН-526	«Фитоскрин-Экспресс-П»	Для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System и/или их аналогах, с пробирками для гомогенизации
EW-001	«Цитосорб/Cytosorb»	Для выделения ДНК/РНК фитопатогенов из растительного сырья, включая сложные образцы
EW-002	«МетаГен/MetaGen»	Для выделения нуклеиновых кислот из образцов почвы, ила, гнили и прочих образцов, содержащих гуминовые кислоты
EX-511	«ДНК-Экстран-2»	Для выделения ДНК из тканей животных и человека (подходит для выделения ДНК из нематод)
EX-513	«ДНК-Экстран-3»	Для выделения ДНК из тканей растений
GM-503	«СОРБ-ГМО-Б»	Для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов

Наборы реагентов для выявления фитопатогенов

Кат. №	Название набора	Назначение набора
Наборы реагентов для обнаружения патогенов картофеля		
Бактерии:		
РН-001	«Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus-PB»	Для выявления ДНК возбудителя кольцевой гнили картофеля
РН-002*	«Ralstonia solanacearum (paca 3, bv.2)-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бурой гнили картофеля
РН-012	«Ralstonia solanacearum (paca 3, bv.2), Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicum-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК возбудителя бурой и кольцевой гнили картофеля
РН-019*	«Candidatus Liberibacter solanacearum-PB»	Для выявления ДНК возбудителя заболевания картофеля «Зебра чипсов»
РН-008	«Dickeya-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК D. solani и D. dianthicola (возбудителей заболевания картофеля «чёрная ножка»)
РН-020	«Candidatus Phytoplasma solani-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины
РН-031	«Dickeya spp-PB»	Для выявления возбудителей заболевания картофеля «чёрная ножка»
РН-032	«Pectobacterium spp-PB»	Для выявления ДНК возбудителей заболевания картофеля «чёрная ножка»
РН-044	«Pectobacterium wasabiae+Pectobacterium atrosepticum-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК возбудителей заболевания картофеля «чёрная ножка»
РН-029	«Pecto Dif-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК P. carotovorum subsp. carotovorum, P. carotovorum subsp. brasiliensis и P. carotovorum subsp. odoriferum (возбудителя заболевания картофеля «чёрная ножка»)
Нематоды:		
РН-100м*	«Globodera pallida и Globodera rostochiensis-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК бледной и золотистой нематоды
РН-103	«Ditylenchus destructor-PB»	Для выявления ДНК стеблевой нематоды картофеля
Грибы:		
РН-009*	«Synchytrium endobioticum-PB»	Для выявления ДНК возбудителя рака картофеля
РН-052*	«Stagonosporopsis andigena-PB»	Для выявления ДНК возбудителя фомозной пятнистости листьев картофеля
РН-072	«Phytophthora infestans-PB»	Для выявления ДНК возбудителя фитофтороза

Кат. №	Название набора	Назначение набора
Вирусы и вироиды:		
PV-001	«Potato Virus X и Potato Virus Y-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-002	«Potato Virus M и Potato Leafroll Virus-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-003	«Potato Virus S и Potato Virus A-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-004*	«Potato spindle tuber viroid-PB»	Для выявления РНК вириода веретеновидности клубней картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-005	«Potato Virus X, Y, M, L, S, A, PSTVd-PB»	Для выявления РНК вирусов (PVX, PVY, PVM, PLRV, PVA, PVS и PSTVd) картофеля (состоит из комплекта наборов PV-001, PV-002, PV-003, PV-004)
PV-011*	«Andean potato mottle virus-PB»	Для выявления РНК андийского комовируса крапчатости картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-012*	«Andean potato latent virus-PB»	Для обнаружения РНК андийского латентного вируса картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-013	«Potato Virus M, Potato Virus Y, Potato Virus S-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-014	«Potato mop-top virus-PB»	Для обнаружения РНК вируса метельчатости верхушек картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-036*	«Potato black ringspot virus-PB»	Для выявления РНК вируса чёрной кольцевой пятнистости картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ
PV-016*	«Potato yellowing alfamovirus-PB»	Для выявления РНК Potato yellowing alfamovirus методом полимеразной цепной реакции в реальном времени совмещённой с реакцией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР-РВ)
Наборы реагентов для обнаружения патогенов овощных культур		
РН-006*	«Acidovorax citrulli-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур
РН-010*	«Beet necrotic yellow vein virus-PB»	Для выявления РНК вируса некротического пожелтения жилок сахарной свеклы (ризомания сахарной свеклы) методом ОТ-ПЦР-РВ
РН-018*	«Tomato yellow leaf curl disease-PB»	Для выявления ДНК бегомовирусов, возбудителей болезни желтой курчавости листьев томата
РН-028*	«Tomato ringspot virus-PB»	Для выявления РНК вируса кольцевой пятнистости томата методом ОТ-ПЦР-РВ
РН-041	«Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального рака томата

* Карантинный патоген растений

Кат. №	Название набора	Назначение набора
РН-042*	«Tomato spotted wilt virus-PB»	Для выявления РНК вируса бронзовости томата методом ОТ-ПЦР-PB
РН-043*	«Tomato brown rugose fruit virus-PB»	Для выявления РНК вируса коричневой морщинистости плодов томата методом ОТ-ПЦР-PB
РН-045*	«Pepino mosaic virus-PB»	Для выявления РНК вируса мозаики пепино методом ОТ-ПЦР-PB
Наборы реагентов для обнаружения патогенов винограда		
РН-005*	«Xylophilus ampelinus-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального увядания винограда
РН-007*	«Xylella fastidiosa-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериоза винограда (болезнь Пирса)
РН-020	«Candidatus Phytoplasma solani-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины
РН-023*	«Candidatus Phytoplasma vitis-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы золотистого пожелтения винограда
РН-033	«Candidatus Phytoplasma solani + Candidatus Phytoplasma vitis»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины и фитоплазмы золотистого пожелтения винограда
Наборы реагентов для обнаружения патогенов зерновых и бобовых культур		
РН-004*	«Pantoea stewartii-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального вилта кукурузы
РН-025*	«Xanthomonas oryzae pv. oryzae-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального ожога риса
РН-035*	«Cercospora kikuchii-PB»	Для выявления ДНК возбудителя пурпурного церкоспороза сои
РН-017	«Barley yellow dwarf virus-PB»	Для выявления РНК вируса жёлтой карликовости ячменя методом ОТ-ПЦР-PB
РН-034	«Barley stripe mosaic virus-PB»	Для выявления РНК вируса штриховатой мозаики ячменя методом ОТ-ПЦР-PB
РН-038	«Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens-PB»	Для выявления ДНК возбудителя ржаво-бурой пятнистости листьев фасоли
РН-039	«Pseudomonas fuscovaginae-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериальной гнили влагалища листа пшеницы
РН-040*	«Tobacco ringspot virus-PB»	Для выявления РНК вируса кольцевой пятнистости табака методом ОТ-ПЦР-PB
РН-046*	«Xanthomonas oryzae pv. oryzicola-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериальной полосатости риса

Кат. №	Название набора	Назначение набора
РН-049	«Wheat streak mosaic virus-PB»	Для выявления РНК вируса полосатой мозаики пшеницы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, совмещённой с реакцией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР-PB)
РН-053	«Pseudomonas syringae pv. pisi-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального ожога гороха
РН-054*	«Tilletia controversa-PB»	Для выявления ДНК возбудителя карликовой головни пшеницы
РН-055*	«Tilletia indica-PB»	Для выявления ДНК возбудителя индийской головни пшеницы
РН-057*	«Rathayibacter tritici-PB»	Для выявления ДНК возбудителя жёлтого слизистого бактериоза пшеницы
РН-060	«Maize chlorotic mottle virus-PB»	Для обнаружения РНК вируса хлоротической крапчатости кукурузы
РН-061*	«Stenocarpella maydis-PB»	Для выявления ДНК возбудителя диплоидоза кукурузы
РН-062	«Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola-PB»	Для выявления ДНК возбудителя угловатой пятнистости фасоли
РН-104*	«Heterodera glycines-PB»	Для выявления ДНК соевой цистообразующей нематоды
РН-065*	«Bipolaris zeicola-PB»	Для выявления ДНК возбудителя пятнистости листьев кукурузы
РН-067	«Xanthomonas translucens pv. translucens-PB»	Для выявления ДНК возбудителя черного бактериоза зерновых культур
РН-068	«Xanthomonas phaseoli pv. phaseoli-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального ожога фасоли
РН-070	«Clavibacter nebraskensis-PB»	Для выявления ДНК возбудителя вилта Госсса
РН-071	«Diaporthe caulivora-PB»	Для выявления ДНК возбудителя рака стеблей сои
Наборы реагентов для обнаружения патогенов масличных культур		
РН-047*	«Diaporthe helianthi-PB»	Для выявления ДНК возбудителя фомопсиса подсолнечника
РН-069	«Leptosphaeria maculans-PB»	Для выявления ДНК возбудителя фомоза рапса
Наборы реагентов для обнаружения патогенов плодово-ягодных культур		
РН-021*	«Candidatus Phytoplasma mali-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы пролиферации яблони
РН-022*	«Candidatus Phytoplasma pyri-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы истощения груши
РН-024*	«Monilinia-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК Monilinia fructicola, а также Monilinia fructigena, polystroma и laxa

Кат. №	Название набора	Назначение набора
РН-003*	«Erwinia amylovora-PB»	Для выявления ДНК возбудителя ожога плодовых деревьев
РН-011*	«Plum pox potyvirus-PB»	Для выявления РНК вируса шарки (оспы) сливы методом ОТ-ПЦР-РВ
РН-014	«Prunus necrotic ring spot ilarvirus-PB»	Для выявления РНК иларвируса некротической кольцевой пятнистости косточковых методом ОТ-ПЦР-РВ
РН-015	«Prune dwarf ilarvirus-PB»	Для выявления РНК иларвируса карликовости сливы методом ОТ-ПЦР-РВ
РН-030*	«Colletotrichum acutatum complex-PB»	Для выявления ДНК грибов видового комплекса Colletotrichum acutatum
РН-037*	«Raspberry ringspot nepovirus-PB»	Для выявления РНК вируса кольцевой пятнистости малины методом ОТ-ПЦР-РВ (готовая лиофилизированная ПЦР-смесь в стрипованных ПЦР-пробирках)
РН-048	«Candidatus Phytoplasma sp.-PB»	Для выявления ДНК группы фитоплазм Candidatus Phytoplasma методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)
РН-063*	«Diaporthe vaccinii-PB»	Для выявления ДНК возбудителя вязкой гнили черники
РН-066*	«Peach latent mosaic viroid-PB»	Для выявления РНК вириода латентной мозаики персика
Наборы реагентов для обнаружения патогенов декоративных растений		
РН-013*	«Impatiens necrotic spot virus-PB»	Для выявления РНК вируса некротической пятнистости бальзамина методом ОТ-ПЦР-РВ
РН-027*	«Chrysanthemum stunt pospoviroid-PB»	Для выявления РНК вириода карликовости хризантем методом ОТ-ПЦР-РВ
РН-051*	«Stagonosporopsis chrysanthemi-PB»	Для выявления ДНК возбудителя аскохитоза хризантем
РН-056*	«Xanthomonas hyacinthi-PB»	Для выявления ДНК возбудителя желтой болезни гиацинта
РН-059*	«Puccinia horiana-PB»	Для выявления ДНК возбудителя белой ржавчины хризантем
РН-064*	«Burkholderia caryophylli-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального вилта гвоздики
Наборы реагентов для обнаружения патогенов древесных растений		
РН-102*	«Bursaphelenchus xylophilus-PB»	Для выявления ДНК сосновой стволовой нематоды
РН-050*	«Phytophthora ramorum-PB»	Для выявления ДНК возбудителя фитофтороза древесных и кустарниковых культур
РН-058*	«Ceratocystis fagacearum-PB»	Для выявления ДНК возбудителя сосудистого микоза дуба
РН-073*	«Lecanosticta acicola-PB»	Для выявления ДНК возбудителя коричневого пятнистого ожога хвои сосны
РН-074*	«Hymenoscyphus fraxineus»	Для выявления ДНК возбудителя сухoverшинности ясеня

Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени разработаны и апробированы в ООО «НПФ Синтол»

Список сокращений

- **EPPO** – (от англ. European and Mediterranean Plant Protection Organization) Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений
- **PBS** – (от англ. Phosphate-buffered saline) фосфатно-солевой буфер
- **ВНИИКР** – Всероссийский центр карантина растений
- **ВПК** – внутренний положительный контроль
- **ГМО** – генетически модифицированный организм
- **ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
- **кДНК** – комплементарная ДНК
- **МККЗР** – Международная конвенция по карантину и защите растений
- **НК** – нуклеиновая кислота
- **ОКО** – отрицательный контрольный образец
- **ОКО-В** – отрицательный контрольный образец выделения
- **ОТ-ПЦР** – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- **ПАВ** – поверхностно-активное вещество
- **ПКО** – положительный контрольный образец
- **ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- **ПЦР-РВ** – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- **РНК** – рибонуклеиновая кислота
- **ЦТАБ** – цетилтриметиламмония бромид
- **Ct** – (от англ. threshold cycle) – пороговый цикл
- **Cq** – (от англ. quantification cycle) – цикл количественного определения
- **ddH₂O** – дистиллированная вода
- **ТЕ-буфер** – буферный раствор, содержащий **Tris** и **EDTA** (этилендиаминтетрауксусную кислоту)
- **ИФА** – иммуноферментный анализ
- **ИХА** – иммунохроматографический анализ
- **NGS** – (от англ. Next-Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения
- **РБ** – реакционный буфер

Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени подготовлены на основе исследований, проведённых ООО «НПФ Синтол» в составе:

Кузубов А.В., Алексеев Я.И., Шварцев А.А., Конышева М.Л., Савинова С.А., Самарина М.А.

Контактные данные производителя

Рекламации направлять в ООО «НПФ Синтол»:

125499, Москва, Кронштадтский бульвар, д. 39, к.1, пом. 1, ком. 43/РМ 12-3

Тел.: (495) 984-69-93

E-mail: syntol@syntol.ru

Генеральный директор ООО «НПФ Синтол»



А.В. Кузубов

1 сентября 2026 г.



ООО «НПФ Синтол»

info@syntol.ru
www.syntol.ru

