



**Методические рекомендации
для диагностики
фитопатогенов методом
полимеразной цепной
реакции в реальном
времени**

Москва, 2023 г.



Методические рекомендации для

диагностики фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени разработаны и апробированы в ООО «Научно-производственная фирма Синтол».

Согласовано

Генеральный директор
ООО «НПФ Синтол»



Handwritten signature of A.V. Kuzubov and a blue circular stamp. The stamp contains the text: "ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ * ООО «НПФ Синтол» * Фирма * МОСКВА * ИНН 10677088232005".

А.В. Кузубов

27 июля 2023 г.

Справочная информация

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

- PM 7/59 (2) *Clavibacter sepedonicus* EPPO Bulletin. 2022; 52:262–285
- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

2. *Ralstonia solanacearum* (раса 3, bv.2), бурая гниль картофеля

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

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

- PM 7/143 (1) '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Bulletin OEPP/EPPO Bulletin(2020)50(1), 49–68
- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

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

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

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

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

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

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

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

- 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 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 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 Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов
- СТО ВНИИКР 6.001–2010

11. *Synchytrium endobioticum*, рак картофеля

- PM 7/28 (2) *Synchytrium endobioticum* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 47, 420–440

- 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* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 46, 444–462
- 67-2015 МР ВНИИКР
- 13. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактериальный рак томата**
- PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp.*michiganensis* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin(2016)46(2), 202–225
- 14. *Xylophilus ampelinus*, бактериальное увядание винограда**
- PM 7/96 (1) *Xylophilus ampelinus* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin39, 403–412
- 69-2014 МР ВНИИКР
- 15. *Xylella fastidiosa*, бактериоз винограда, болезнь Пирса**
- PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin49, 175–227
- 16. *Candidatus Phytoplasma vitis*, золотистое пожелтение винограда**
- PM 7/079 (2) Grapevine flavescence doree phytoplasma Bulletin OEPP/EPPO Bulletin46, 78–9
- 2014 МР ВНИИКР
- 17. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, бактериальный вилт кукурузы**
- PM 7/60 (2) *Pantoea stewartii* subsp.*stewartii* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin46, 226–236
- СТО ВНИИКР 4.002–2010
- 18. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, бактериальный ожог риса**
- PM 7/80 (1) *Xanthomonas oryzae* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin37, 543– 553
- 49-2014 МР ВНИИКР
- 19. *Cercospora kikuchii*, пурпурный церкоспороз сои**
- 96-2017 МР ВНИИКР
- 20. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, ржаво-бурая пятнистость листьев фасоли (сои)**
- PM 7/102 (1) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.*flaccumfaciens* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin41, 320–328
- 21. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, бактериальная полосатость риса**
- PM 7/80 (1) *Xanthomonas oryzae* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin37, 543– 553
- 49-2014 МР ВНИИКР
- 22. *Diaporthe helianthi*, фомопсис подсолнечника**
- СТО ВНИИКР 3.006–2011
- 23. *Candidatus Phytoplasma mali*, пролиферация яблони**
- PM 7/62 (3) ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘Ca. P. pyri’ and ‘Ca.P.prunorum’ Bulletin OEPP/EPPO Bulletin50, 69–85
- 12-2015 МР ВНИИКР

24. Candidatus Phytoplasma pyri, истощение груши

- PM 7/62 (3) 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Ca. P. pyri' and 'Ca. P. prunorum' Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 50, 69–85
- 98-2016 МР ВНИИКР

25. Представители рода Monilinia, монилиозные гнили плодовых

- PM 7/18 (3) Monilinia fructicola Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 50, 5–18
- 73-2015 МР ВНИИКР

26. Erwinia amylovora, ожог плодовых

- PM 7/20 (3) Erwinia amylovora EPPO Bulletin 022; 52:198–224
- СТО ВНИИКР 4.001–2010; 146-2018 МР ВНИИКР

27. Представители Colletotrichum acutatum complex

- 67-2013 МР ВНИИКР

28. Bursaphelenchus xylophilus, сосновая древесная нематода

- PM 7/4 (3) Bursaphelenchus xylophilus Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2013)43(1), 105–118
- 50-2021 МР ВНИИКР

29. Tomato yellow leaf curl disease, желтая курчавости листьев томата

- PM 7/50(1) Tomato yellow leaf curl and Tomato mottle begomoviruses Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 319–325
- 39-2015 МР ВНИИКР

30. Phytophthora ramorum, фитофтороз древесных и кустарниковых культур

- PM 7/66 (1) Phytophthora ramorum Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 145–155
- 30-2014 МР ВНИИКР

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 Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

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

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

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

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

4. Potato spindle tuber viroid, виroid веретеновидности листьев картофеля

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов
- PM 7/33(1) Potato spindle tuber pospiviroid Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34, 257–269
- 38-2015 МР ВНИИКР

5. Andean potato mottle virus, андийский комовирус крапчатости картофеля

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов

6. Andean potato latent virus, андийский латентный вирус картофеля

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов
- PM 7/132 (1) Andean potato latent virus and Andean potato mild mosaic virus Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2018)48(3), 405–413
- СТО ВНИИКР 5.003–2013

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

- ГОСТ Р 59551-2021 Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов
- 47-2019 МР ВНИИКР

8. Tomato ringspot virus, кольцевая пятнистость томата

- 7/49(1) Tomato ringspot nepovirus Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 313-318
- 47-2013 МР ВНИИКР

9. Tomato spotted wilt virus, бронзовость (увядания) томата

- 02-2020 МР ВНИИКР

10. Tomato brown rugose fruit virus, коричневая морщинистость плодов томата

- PM 7/146 (1) Tomato brown rugose fruit virus EPPO Bulletin Volume 51, Issue 1 p. 178-197
- 01-2020 МР ВНИИКР

11. Pepino mosaic virus

- PM 7/113 (1) Pepino mosaic virus Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2013)43(1), 94-104
- 60-2019 МР ВНИИКР

12. Tobacco ringspot virus, вирус кольцевой пятнистости табака

- PM 7/2 (2) Tobacco ringspot virus Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2017)47(2), 135-145
- 69-2013 МР ВНИИКР

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

- PM 7/32(1) Plum pox potyvirus Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34, 247-256
- СТО ВНИИКР 5.002–2011

14. Impatiens necrotic spot virus, вирус некротической пятнистости бальзамина

- 71-2012 МР ВНИИКР

15. Chrysanthemum stunt pospoviroid, вириод карликовости хризантем

- PM 7/138 (1) Pospiviroids (genus Pospiviroid) EPPO Bulletin Volume 51, Issue 1 p. 144-177
- 29-2016 МР ВНИИКР

16. Beet necrotic yellow vein virus, ризомания сахарной свеклы

- PM 7/ 30 (3) Beet necrotic yellow vein virus EPPO Bulletin. 2022; 52:87-97
- 70-2012 МР ВНИИКР

Оглавление

Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов, часть 1 «Наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот (НК)»	8
Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов, часть 2 «Наборы реагентов для ПЦР в реальном времени»	36
Область применения	37
Меры предосторожности при работе с набором	40
Проведение анализа	43
Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ	47
Обработка результатов ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ	70
Интерпретация результатов анализа	72
Пример диагностики растительного материала на наличие нуклеиновых кислот фитопатогенов	77
Примеры результатов ОТ-ПЦР-РВ/ПЦР-РВ анализа на приборах разных производителей	80
Приложение А Наборы реагентов для выявления фитопатогенов	92
Список сокращений	98

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

Выделение нуклеиновых кислот из растительного материала

	Минимальное время выделения 1 образца без пробоподготовки	РНК вирусы /вириоды 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)

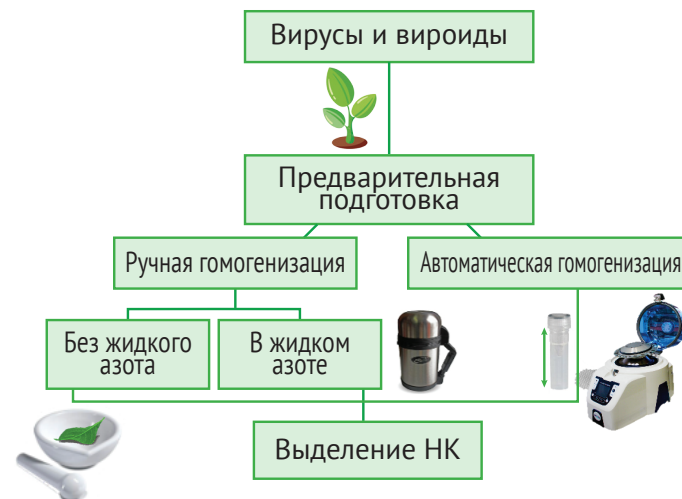
3— подходит для образцов с высоким содержанием вторичных метаболитов (виноград, плодово-ягодные)

4— подходит для простых в выделении образцов (культуры грибов/бактерий, выделение ДНК из молодых листьев).

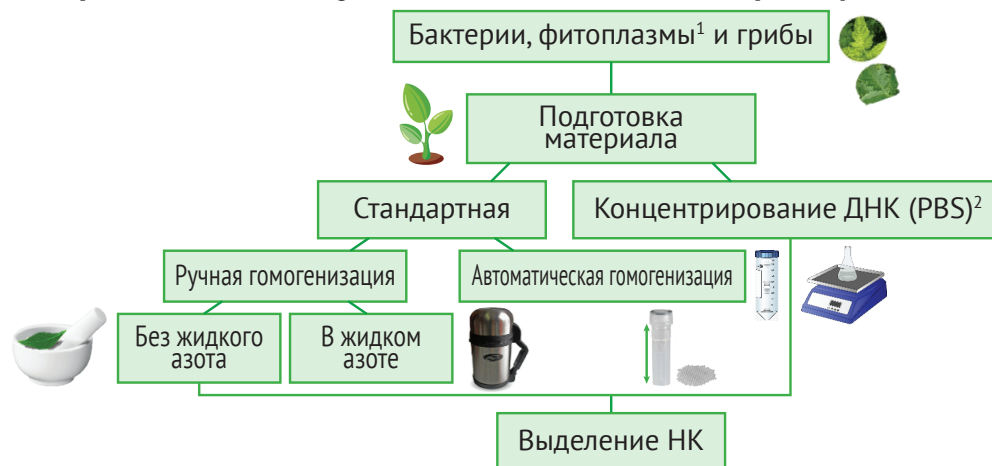
Не подходит для выделения РНК вирусов!

Схемы проведения предварительной подготовки и выделения НК из растительного материала

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



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

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 ручным способом.

В состав набора реагентов «Сорб-ГМО-Б» входят следующие компоненты:

1. Лизирующий раствор
2. Протеиназа К
3. Экстрагирующий раствор
4. Осаждающий раствор
5. Сорбент
6. Промывочный раствор А
7. Промывочный раствор Б
8. Промывочный раствор В
9. Элюирующий раствор

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.

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 (чем более неоднородный образец, тем большая навеска необходима)	50-200 мг
Влажные образцы	50-200 мг
Жидкие образцы	100-300 мкл

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. 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 **ГМ-503 «Сорб-ГМО-Б»**.

Возможные трудности при выделении НК набором GM-503 «Сорб-ГМО-Б».

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.

EW-001 «ЦитоСорб/CytoSorb» – набор реагентов для выделения ДНК фитоплазм из растительного материала.

Рассчитан на 50 выделений при ручной гомогенизации.

В состав набора реагентов «**ЦитоСорб/CytoSorb**» входят следующие компоненты:

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

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, виридов, 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.

Условия транспортирования и возможного 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.

Анализируемые пробы. Рекомендуемая навеска в соответствии с типом образца¹

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			
Грибная инфекция			
Вирусная/виroidная инфекция	20-100	60-200	

¹ – в случае выделения из сухих частей растения, количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза

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 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.

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 сек.
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 3 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. Инкубировать 10 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
8. Центрифугировать 5000 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.
2. В пробирки с экстрагирующим буфером добавить 200мкл образца.
3. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе. Перейти к пункту 2 этапа **Лизис**.

Автоматическая гомогенизация

1. Поместить исследуемый растительный образец (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») в пробирку с шариками для гомогенизации при помощи стерильного одноразового пинцета.
2. Добавить в пробирку с шариками для гомогенизации с образцом 1 мл экстрагирующего буфера.
3. Установить подготовленные пробирки в ротор гомогенизатора Precellys Evolution Bertin Technologies (или аналогичного). Запустить программу гомогенизации: **10000rpm/15sec pause 30sec 4 повтора**.
4. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
5. 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 3 этапа **Пробоподготовка Автоматическая гомогенизация**.

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

Возможные трудности при использовании выделенных образцов НК

Ингибирование ПЦР	50-100 мг 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.

EX-513-100 «ДНК–Экстран-3» – набор реагентов предназначен для выделения геномной ДНК из растений.

В состав набора реагентов «ДНК–Экстран-3» входят следующие компоненты:

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

Выделение нуклеиновых кислот с помощью набора **EX-513-100 «ДНК–Экстран-3»**

Набор реагентов предназначен для выделения геномной ДНК из образцов зеленых тканей растений. Выход ДНК составляет 3-4 мкг из 10 мг ткани. Чистота ДНК A260/280 =1,8-1,9.

Протокол выделения ДНК

Внесение образца

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 10-30 мг свежей или замороженной ткани

Лизис клеток

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

Осаждение белков

1. К лизату добавить 100 мкл Осаждающего раствора 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе 20 секунд.
2. Центрифугировать смесь при 13 000 об. 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

1. Супернатант, содержащий ДНК, перенести в полном объеме, не задевая осадок в чистые 1.5 мл пробирки.
2. Добавить 300 мкл Осаждающего раствора 2 и перемешать переворачиванием (8–10 раз) до появления видимого осадка ДНК.
3. 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

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

EX-511-100 «ДНК–Экстран-2» – набор реагентов предназначен для выделения геномной ДНК из образцов тканей животных.

В состав набора реагентов «ДНК–Экстран-2» входят следующие компоненты:

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

Протокол выделения ДНК

Внесение образца

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

1. 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-меркаптоэтанола.
2. Внести в пробирки по 10 мкл раствора Протеиназы К и перемешать на вортексе.
3. Оставить на ночь при температуре 56°C.

Осаждение белков

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

Осаждение ДНК

1. В чистые пробирки 1.5-2 мл внести по 2 мкл соосадителя ДНК.
2. Супернатант, содержащий ДНК, перенести в полном объеме в пробирки с соосадителем ДНК.
3. Добавить 300 мкл Осаждающего раствора 2 и перемешать переворачиванием (10-12 раз) до появления видимого осадка ДНК.
4. Центрифугировать смесь при 13 000 об/мин. 5 мин. Осторожно слить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге.

Промывка и растворение ДНК

1. Добавить 400 мкл Промывочного раствора и перемешать несколько раз переворачиванием для промывки ДНК.
2. Центрифугировать 2 мин при 13 000 об/мин. Осторожно удалить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге.
3. Открытые пробирки подсушить на воздухе или в термостате при 37°C 10-15мин до полного высыхания.
4. Добавить к осадку 30-50 мкл Элюирующего раствора. Перемешать и прогреть при 65°C 5 мин до растворения ДНК.

Полученный раствор ДНК хранить при -20 °C.

Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4 °C.

РН-520 «ФитоСорб» – набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Рассчитан на 50 выделений, включая контрольные образцы.

В состав набора реагентов «ФитоСорб» входят следующие компоненты:

1. Экстрагирующий буфер (PBS)
2. Лизирующий раствор
3. Сорбирующий раствор

4. Осаждающий раствор
5. Промывочный раствор
6. Промывочный раствор
7. Элюирующий буфер
8. Деионизованная вода

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

Набор реагентов **«ФитоСорб»** 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 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.

Условия транспортирования и возможного 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.

Рекомендованные количества образца¹

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

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

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.

Выделение нуклеиновых кислот с помощью набора **РН-520 «ФитоСорб»**

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 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, 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 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, Сорбция и осаждение, Промывка, Элюция выполняются согласно инструкции к набору **РН-520 «ФитоСорб»**.

Возможные трудности при выделении НК набором РН-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.)

РН-521 «ФитоСорб-Автомат-24» – набор реагентов для автоматического выделения нуклеиновых кислот из растительного материала на роботизированных станциях TECAN. Рассчитан на 24 выделения, включая контрольные образцы.

В состав набора реагентов **«ФитоСорб-Автомат-24»** входят следующие компоненты:

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

РН-522 «ФитоСорб-Автомат-48» – набор реагентов для автоматического выделения нуклеиновых кислот из растительного материала на роботизированных станциях TECAN. Набор рассчитан на 48 выделений, включая контрольные образцы.

В состав набора реагентов **«ФитоСорб-Автомат-48»** входят следующие компоненты:

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

Наборы реагентов **«ФитоСорб-Автомат-24»** и **«ФитоСорб-Автомат-48»** предназначены для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Наборы могут 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-24»** или **«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.

Транспортировку и хранение образцов для анализа проводят в соответствии с утвержденными протоколами ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов.

Рекомендованные количества образца¹

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

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

Выделение нуклеиновых кислот с помощью наборов РН-521 «ФитоСорб-Автомат-24» и «РН-522 «ФитоСорб-Автомат-48».

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 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 выделение ДНК на автоматизированных станциях выполняется согласно инструкциям к наборам РН-521 «ФитоСорб-Автомат-24» или РН-522 «ФитоСорб-Автомат-48».

РН-523 «ФитоСорб-П» – набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Рассчитан на 50 выделений при автоматической гомогенизации.

В состав набора реагентов «ФитоСорб-П» входят следующие компоненты:

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

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

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, 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-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 образца¹

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

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

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: 9500rpm/15sec pause 30sec 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.

Условия транспортирования и возможного 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.

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»:

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.)

РН-524 «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.

В состав набора реагентов «Фитоскрин-Экспресс» входят следующие компоненты:

1. Экстрагирующий буфер (PBS)
2. Лизирующий раствор, ЛОР
3. Сорбирующий раствор, СР
4. Промывочный раствор, ПР
5. Элюирующий буфер, ЭР
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 набора «Экстрагирующий буфер (PBS)» содержит азид натрия.

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, 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 «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 образца¹

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

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

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, в случае 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 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.

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.

Условия транспортирования и возможного 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.

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-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» (<http://www.syntol.ru/>).

Возможные трудности при выделении НК набором

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.)

РН-526 «Фитоскрин-Экспресс-П» – набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или их аналогах.

В состав набора реагентов «Фитоскрин-Экспресс-П» входят следующие компоненты:

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

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 образца¹

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

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

Выделение нуклеиновых кислот с помощью набора РН-526 «Фитоскрин-Экспресс-П»

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: 9500rpm/15sec pause 30sec 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.

Условия транспортирования и возможного 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.

Проведение выделения

Дальнейшее проведение анализа, этапы Лизис, Сорбция и осаждение, Промывка, Элюция выполняются согласно инструкции к набору РН-526 «Фитоскрин-Экспресс-П».

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» (<http://www.syntol.ru/>).

Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов, часть 2

Наборы реагентов для ПЦР в реальном времени

Содержит:

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

1. *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, кольцевая гнили картофеля
2. *Ralstonia solanacearum* (раса 3, bv.2) и *Ralstonia solanacearum* (раса 1, bv.1), бурая гниль картофеля
3. *Candidatus Liberibacter solanacearum*, «зебра чип»
4. Род бактерий *Dickeya*, черная ножки и мягкая гнили картофеля
5. *Candidatus Phytoplasma solani*, столбур картофеля и почернение древесины винограда
6. *Dickeya solani* и *D. dianthicola*, черная ножка картофеля
7. Род *Pectobacterium*, черная ножка и мягкая гниль
8. *Pectobacterium wasabiae* и *P. atrosepticum*, черная ножка и мягкая гниль картофеля
9. *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *P. carotovorum subsp. brasiliensis* и *P. carotovorum subsp. odoriferum*, черная ножка картофеля
10. *Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis*, бледная и золотистая картофельная нематоды
11. *Synchytrium endobioticum*, рак картофеля
12. *Acidovorax citrulli*, бактериальная пятнистость тыквенных культур
13. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, бактериальный рак томата
14. *Xylophilus ampelinus*, бактериальное увядание винограда
15. *Xylella fastidiosa*, бактериоз винограда, болезнь Пирса
16. *Candidatus Phytoplasma vitis*, золотистое пожелтение винограда
17. *Pantoea stewartii subsp. stewartii*, бактериальный вилт кукурузы
18. *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, бактериальный ожог риса
19. *Cercospora kikuchii*, пурпурный церкоспороз сои
20. *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*, ржаво-бурая пятнистость листьев фасоли (сои)
21. *Pseudomonas fuscovaginae*, бактериальная гниль влагалища листа пшеницы
22. *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*, бактериальная полосатость риса
23. *Diaporthe helianthi*, фомопсис подсолнечника
24. *Candidatus Phytoplasma mali*, пролиферация яблони
25. *Candidatus Phytoplasma pyri*, истощение груши
26. Представители рода *Monilinia*, монилиозные гнили плодовых
27. *Erwinia amylovora*, ожог плодовых
28. Представители *Colletotrichum acutatum* complex

29. *Bursaphelenchus xylophilus*, сосновая древесная нематода
30. *Tomato yellow leaf curl disease*, желтая курчавости листьев томата
31. *Candidatus Phytoplasma*, представители группы фитоплазм
32. *Phytophthora ramorum*, фитофтороз древесных и кустарниковых культур
33. *Stagonosporopsis andigena*, фомозная пятнистость листьев картофеля
34. *Stagonosporopsis chrysanthemi*, аскохитоз хризантем
35. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, бактериальный ожог гороха

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
2. *Potato Virus M* и *Potato Leafroll Virus*, M вирус картофеля и вирус скрученности листьев картофеля
3. *Potato Virus S* и *Potato Virus A*, S и A вирусы картофеля
4. *Potato spindle tuber viroid*, виroid веретеновидности листьев картофеля
5. *Andean potato mottle virus*, андийский комовирус крапчатости картофеля
6. *Andean potato latent virus*, андийский латентный вирус картофеля
7. *Potato black ringspot virus*, вирус черной кольцевой пятнистости листьев картофеля
8. *Beet necrotic yellow vein virus*, вирус некротического пожелтения жилок сахарной свеклы (ризомания сахарной свеклы)
9. *Tomato ringspot virus*, кольцевая пятнистость томата
10. *Tomato spotted wilt virus*, бронзовость (увядания) томата
11. *Tomato brown rugose fruit virus*, коричневая морщинистость плодов томата
12. *Pepino mosaic virus*, вирус мозаики томата
13. *Barley yellow dwarf virus*, вирус желтой карликовости ячменя
14. *Barley stripe mosaic virus*, штриховатая мозаика ячменя
15. *Tobacco ringspot virus*, вирус кольцевой пятнистости табака
16. *Wheat streak mosaic virus*, вирус полосатой мозаики пшеницы
17. *Plum pox potyvirus*, вирус шарки (оспы) сливы
18. *Prunus necrotic ring spot ilarvirus*, иларвирус некротической кольцевой пятнистости косточковых
19. *Prune dwarf ilarvirus*, иларвирус карликовости сливы
20. *Raspberry ringspot nepovirus*, вирус кольцевой пятнистости малины
21. *Impatiens necrotic spot virus*, вирус некротической пятнистости бальзамина
22. *Chrysanthemum stunt pospoviroid*, виroid карликовости хризантем

Область применения

Набор реагентов предназначен для обнаружения ДНК/РНК выше приведенных 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 специфического 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 определенной длины волны данная молекула испускает свет другой длины волны. За счет 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°C, гаситель прекращает поглощать флуоресценцию данной молекулы флуорофора (технология TaqMan). С каждым циклом ПЦР число освобожденных молекул флуорофора экспоненциально возрастает (рисунок 1).

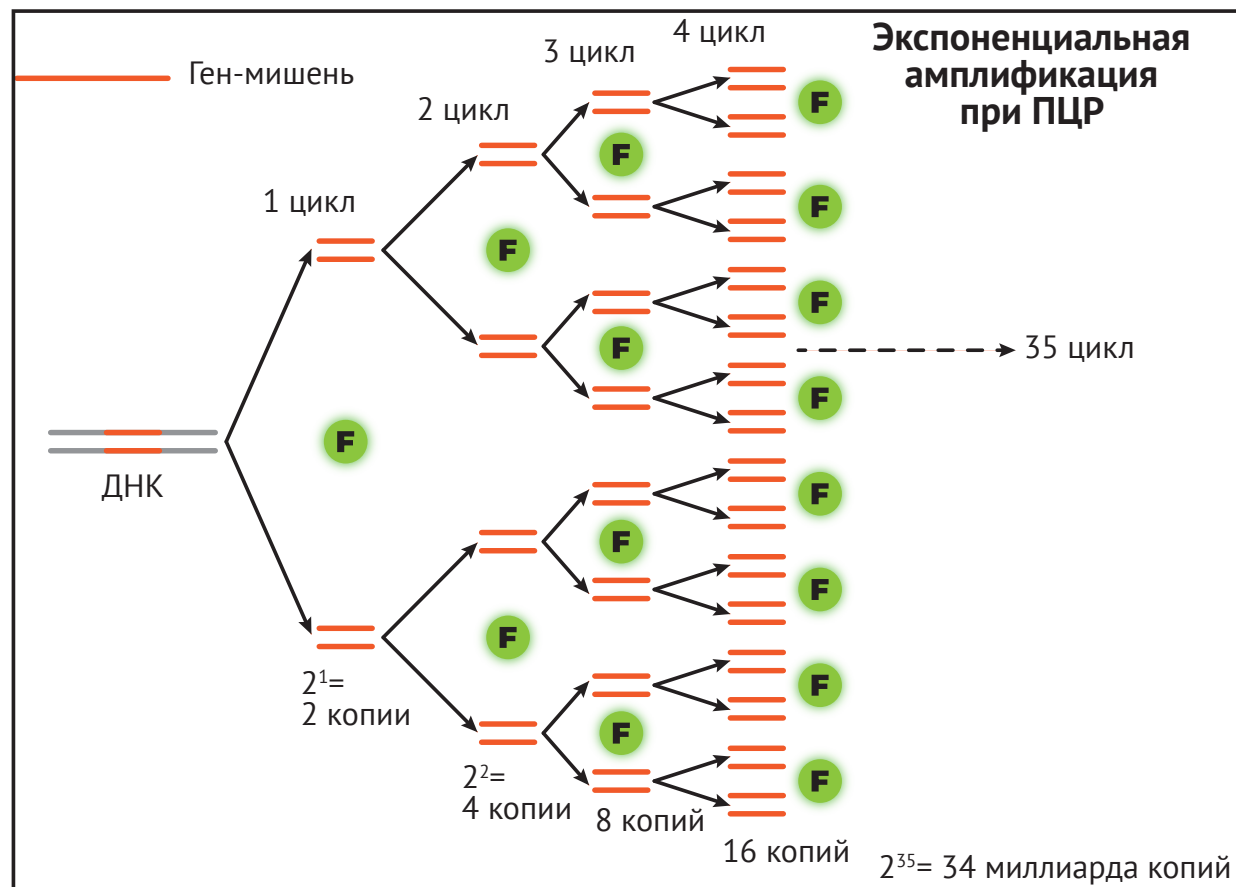


Рисунок 1 – Принцип аналитического процесса

Постановка ПЦР-РВ осуществляется в специальных приборах – амплификаторах, например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), «CFX-96» («BioRad», США), «Rotor Gene» (Qiagen), «ДТпрайм/ДТлайт» («ДНК-технология», Россия), QuantStudio5 (ThermoFisher, США), «Gentier 96E» (Xi'an Tianlong Technology Co., Ltd, Китай) или эквивалентных по характеристикам.

Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени.

Процесс выявления РНК-вирусов/вирионов начинается с реакции обратной транскрипции. 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).

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 за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

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 – 485нм/520нм, №2 – 530нм/560нм, №3 – 580нм/620нм, №4 – 630нм/670нм), 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 10-100мкл;
- Автоматический (механический) дозатор переменного объема на 100-1000мкл;
- Автоматический (механический) дозатор переменного объема на 2-20мкл;
- 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, «PM-2x48x0,2» (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;
- Одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- Комплект средств для обработки рабочего места.

Таблица 1. Типы реакций и целевые каналы детекции

Целевые каналы детекции \ Тип реакции	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-020; 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;	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
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;
FAM/Green + ROX/Orange + R6G/HEX/Yellow/VIC + Cy5/Red (ВПК)	PH-029;	PV-013
R6G/HEX/Yellow/VIC + Cy5/Red (ВПК)	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;	

Проведение анализа

Подготовка к проведению ПЦР-РВ. Жидкие реакционные смеси

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 разведенный препарат ПКО при температуре не выше минус 20 °С.

2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать:

21*(N+2) мкл реакционной смеси

0,5*(N+2) мкл фермент (*SynTaq* (ДНК-полимераза) / ТМ+ – 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 расчет 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 расчета воспользуйтесь таблицей (расчет под 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

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

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

Примечание. Если образец ДНК содержит сорбент (магнитный сорбент), необходимо центрифугировать образцы 1 минуту 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 0,2 мл пробирки 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

Протокол приготовления смеси для набора реагентов PV-013 Набор реагентов «Potato Virus M, Potato Virus Y, Potato Virus S-PV» для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ

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.

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 разведенный препарат ПКО при температуре не выше минус 20 °С.

2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать:

21*(N+2) мкл реакционной смеси «SYM -ВПК»

0,2*(N+2) мкл RPol (смесь ферментов),

где **N** – количество исследуемых образцов, включая **ОКО-В**, **2** – количество контролей (**ПКО, ОКО**) (в случае, если контролей больше чем два, необходимо провести расчет 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 расчета воспользуйтесь таблицей (расчет под 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, ОКО** перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. 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) 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⁻¹.
4. **ПКО** (если уже разведен), **ОКО** и исследуемые образцы разморозить, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировать.

***Примечание.** Если образец РНК содержит сорбент (магнитный сорбент), необходимо центрифугировать образцы 1 минуту 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 наконечники 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	5 mins			1
Cycling	95	15 secs	No acquiring		50
	60	40 secs	Acquiring	Таблица 1	

Для ОТ-ПЦР-РВ

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

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

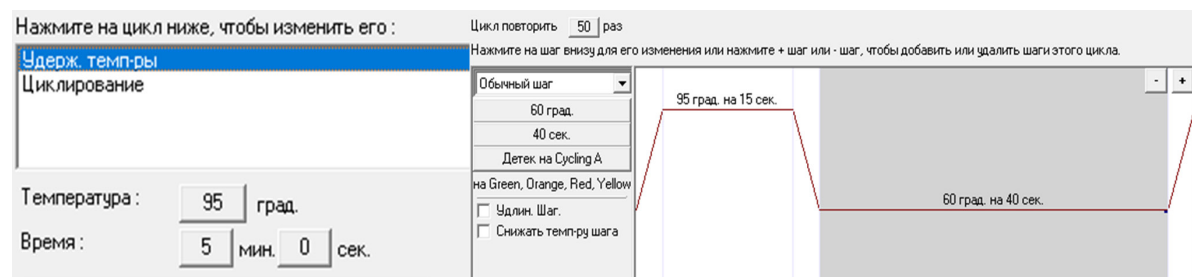
Для ПЦР-РВ набора реагентов PH-029 «Pecto Dif-РВ»

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

Для ПЦР-РВ набора реагентов PH-100м «Globodera pallida и Globodera rostochiensis-РВ»

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

Пример заданной программы амплификации



7. В окне «**Edit Profile / Редактор профиля**» нажать кнопку «**OK**».

8. Установить чувствительность прибора в области настроек «**Chanel Setup / Установка канала**», используя клавишу

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 «**OK / ДА**» для каждого канала.

После закрытия окна «**Auto-Gain Optimization Channel Settings / Установки Авто-оптимизации уровня сигнала**» поставить галочку «**Perform Optimization Before 1 st 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:
Sample Volume 25 µl,

Для ПЦР-РВ

1. 95,0 C for 5:00
 2. 95,0 C for 0:15
 3. 60,0 C for 0:40
+Plate read
 4. GOTO 2, 49
- END

Для ПЦР-РВ набора реагентов PH-029 «Pecto Dif-РВ»

1. 95,0 C for 5:00
 2. 95,0 C for 0:15
 3. 62,0 C for 0:40
+Plate read
 4. GOTO 2, 49
- END

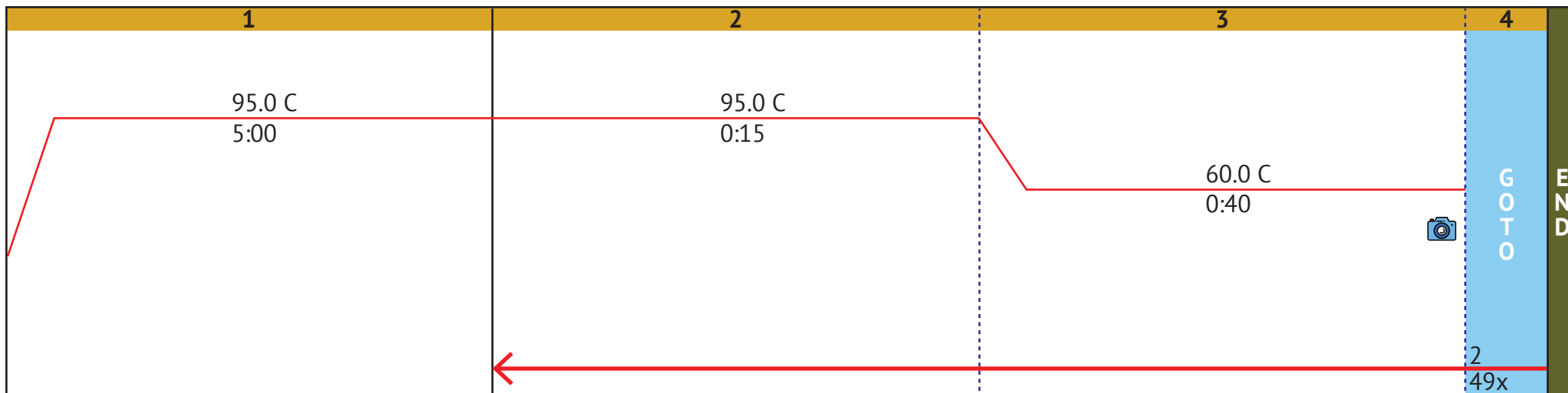
Для ОТ-ПЦР-РВ

1. 45,0 C for 15:00
 2. 95,0 C for 5:00
 3. 95,0 C for 0:15
 4. 60,0 C for 0:40
+Plate read
 5. GOTO 3, 49
- END

Для ПЦР-РВ набора реагентов PH-100м «Globodera pallida и Globodera rostochiensis-РВ»

1. 95,0 C for 5:00
 2. 95,0 C for 0:15
 3. 53,0 C for 0:40
+Plate read
 4. GOTO 2, 44
- END

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



Пример заданной программы амплификации

Нажать **OK** 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 **OK**.

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 п. **Порядок следования образцов**.

Для этого выделить все оставшиеся лунки, в которых находятся пробирки с образцами, и в графе **Sample Type/Тип пробы** выбрать строчку **Unknown/Неизвестен**.

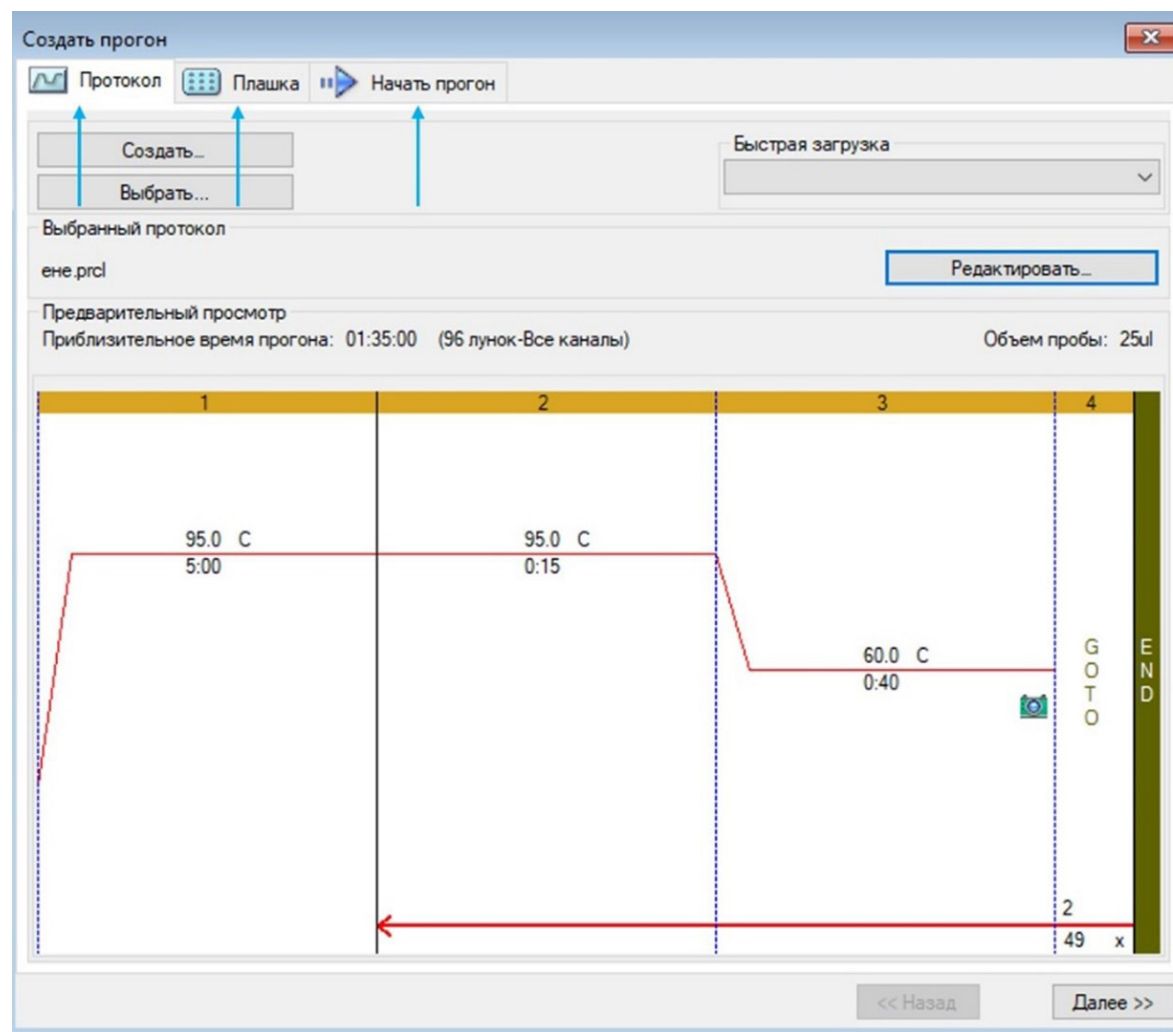
7. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям. Для этого выделить на плашке лунки со всеми исследуемыми пробирками (включая ПКО и ОКО) и поставить галочки в колонке **Load/Имена мишеней Загрузить** напротив названий всех выбранных в (*Таблице 1*) красителей.

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 для приборов АНК-32 (32М, 48)

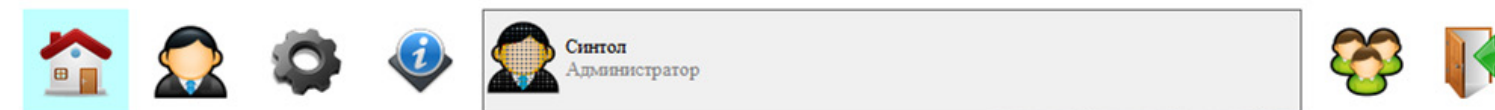
1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

2. Запустить программу ANK Shell.



3. Выбрать вкладку «Быстрый старт».

SYNTOL



Быстрый старт




 **СИНТОЛ**
научно-производственная компания

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

Общее **Амплификатор** Образцы

Название

Название реакции
 Реактор1

Прибор
 48 пробирок

Красители

Краситель	ДНК-мишень	1	1
<input checked="" type="checkbox"/> FAM	FAM	485	520
<input checked="" type="checkbox"/> R6G	R6G	530	560
<input checked="" type="checkbox"/> ROX	ROX	580	620
<input checked="" type="checkbox"/> 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	300	Включено	
Циклограмма (50)				
1	95	15	Включено	
2	60	40	Включено	Включено

Для ОТ-ПЦР-РВ

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

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

Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-029 «Ресто Dif-РВ»

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

Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-100м «Globodera pallida и Globodera rostochiensis-РВ»

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

Общее | Амплификатор | Образцы

+ Изотерма + Циклограмма + Плавление

Изотерма 📅 + ⬆ ⬇ ✖

Температура - 45,0 + Время - 900 + 🔍 ⬆ ⬇ ✖

Изотерма 📅 + ⬆ ⬇ ✖

Температура - 95,0 + Время - 300 + 🔍 ⬆ ⬇ ✖

Циклограмма - 50 + 📅 + ⬆ ⬇ ✖

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
	ПКО1 Реактор1	ОКО1 Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	2	ОКО		ОКО1	Реактор1
									3	ИО		Образцы	Реактор1
B									4	ИО		Образцы	Реактор1
	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	5	ИО		Образцы	Реактор1
									6	ИО		Образцы	Реактор1
C									7	ИО		Образцы	Реактор1
	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	Образцы Реактор1	8	ИО		Образцы	Реактор1
									9	ИО		Образцы	Реактор1
D									10	ИО		Образцы	Реактор1
									11	ИО		Образцы	Реактор1
									12	ИО		Образцы	Реактор1
E									13	ИО		Образцы	Реактор1
									14	ИО		Образцы	Реактор1
									15	ИО		Образцы	Реактор1
F									16	ИО		Образцы	Реактор1
									17	ИО		Образцы	Реактор1
									18	ИО		Образцы	Реактор1
								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_58_Быстрый старт Номер серии:

Комментарий:

Прибор: ANK-48

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

	1	2	3	4	5	6	7	8
▶ A	ПКО1 Реактор1 Образец	ОКО1 Реактор1 Образец	Образец Реактор1 Образец	Образец Реактор1 Образец	Образец Реактор1 Образец	Образец Реактор1 Образец	Образец Реактор1 Образец	Образец Реактор1 Образец
B	 Реактор1 Образец	 Реактор1 Образец	 Реактор1 Образец	 Реактор1 Образец	 Реактор1 Образец	 Реактор1 Образец	 Реактор1 Образец	 Реактор1 Образец
C	 Реактор1	 Реактор1	 Реактор1	 Реактор1	 Реактор1	 Реактор1	 Реактор1	 Реактор1
D								
E								
F								

Info icon, Save icon, Print icon, Flag icon

9. 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 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

Протокол | Запуск программы амплификации

Номер протокола: | Имя Оператора:

	№	Идентификатор	R	Тест	Тип пробирки	Концентрация	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
A1	1	K+	<input type="checkbox"/>		K+	-	-	-	-	-	-
B1	2	K-	<input type="checkbox"/>		K-	-	-	-	-	-	-
C1	3	Образец	<input type="checkbox"/>		□	-	-	-	-	-	-
							-	-	-	-	-

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 °C	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	95.0	5	0	1	
2	95.0	0	15	50	V
	60.0	0	40		

Для ОТ-ПЦР-РВ

№ блока	Температура °C	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	45.0	15	0	1	
	95.0	5	0		
2	95.0	0	15	50*	V
	60.0	0	40		

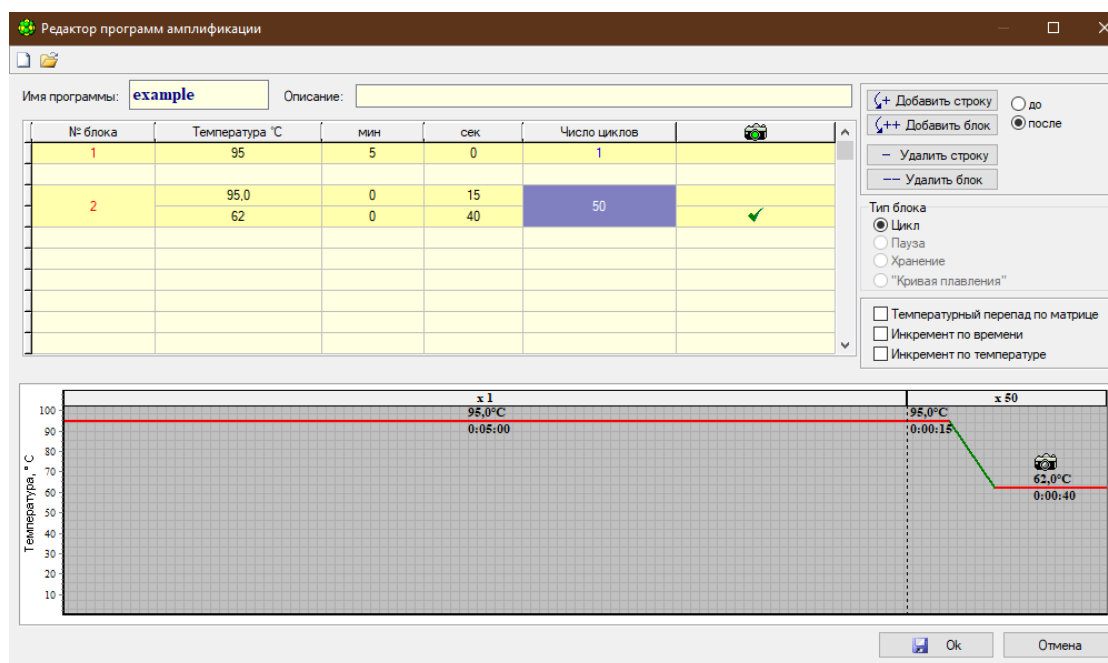
* – количество циклов при использовании наборов реагентов РН-042, РН-043, РН-045 можно сократить до 40

Для ПЦР-РВ набора реагентов PH-029 «Pecto Dif-PB»

№ блока	Температура °C	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	95.0	5	0	1	
2	95.0	0	15	50	V
	62.0	0	40		

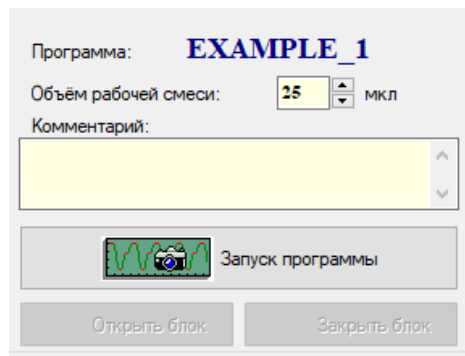
Для ПЦР-РВ набора реагентов PH-100м «Globodera pallida и Globodera rostochiensis-PB»

№ блока	Температура °C	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	95.0	5	0	1	
2	95.0	0	15	45	V
	53.0	0	40		



Пример заданной программы амплификации

7. Отредактировать объём рабочей смеси в пробирке (25 мкл).



8. Нажать кнопку «Запуск программы».

9. 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».

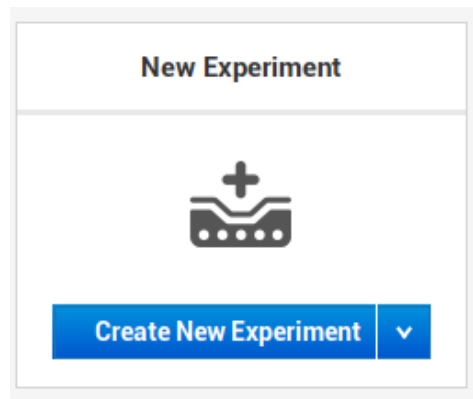
Проведение ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ для прибора QuantStudio5

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

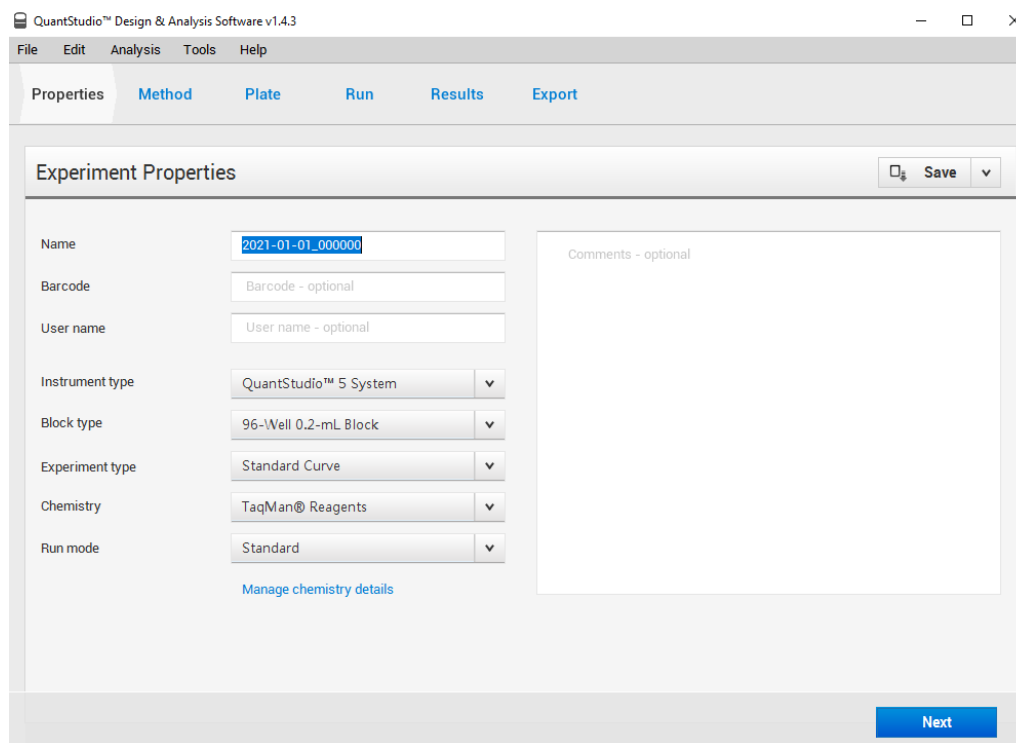
2. Запустить программу «QuantStudio Designs & Analysis Software».



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		60°C	00:40	2,44°C/s		

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		60°C	00:40	2,44°C/s		

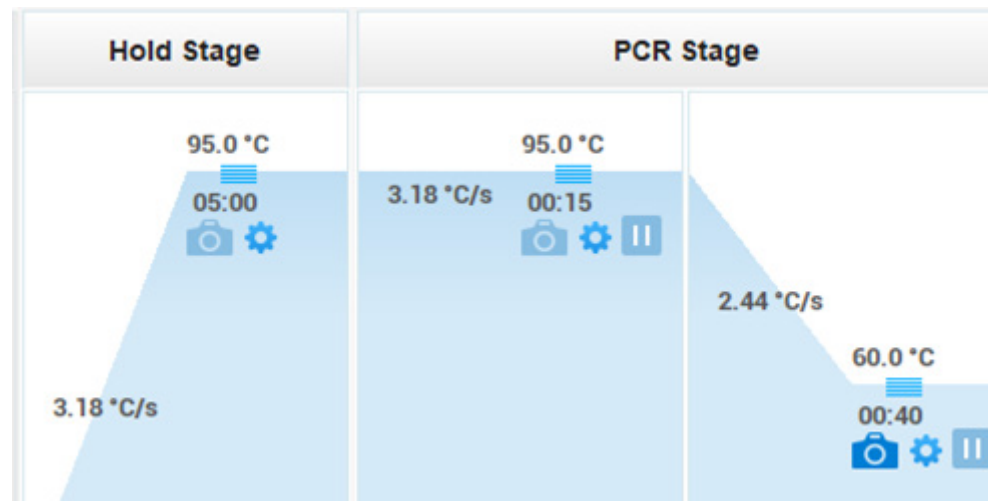
* – количество циклов при использовании наборов реагентов РН-042, РН-043, РН-045 можно сократить до 40

Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-029 «Ресто Dif-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		62°C	00:40	2,44°C/s		

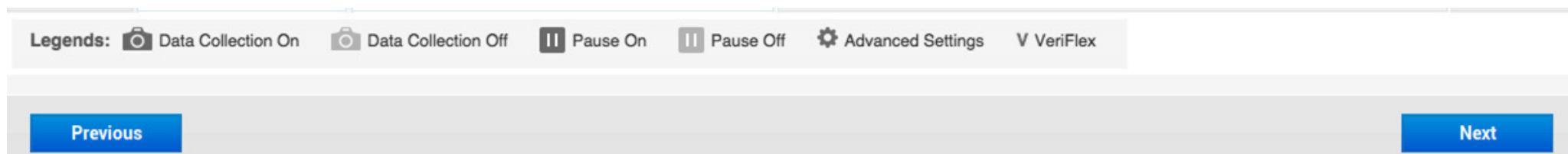
Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-100м «Globodera pallida и Globodera rostochiensis-РВ»

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		45
2		53°C	00:40	2,44°C/s		



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



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
▲1		Name	Reporter	Quencher	Comments	Task	Quantity		
<input type="checkbox"/>	■	FAM	FAM	None		▼		✕	
<input type="checkbox"/>	■	HEX/R6G	VIC	None		▼		✕	
<input type="checkbox"/>	■	ROX	ROX	None		▼		✕	
<input type="checkbox"/>	■	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 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 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	95,0	None
2	2 Step Amplification	50	00:15	95,0	None
			00:40	60,0	Reading

Для ОТ-ПЦР-РВ

Stage	Stage Type	Cycle	Time	Temperature	Fluorescence
1	Preincubation	1	15:00	45,0	None
2	Preincubation	1	05:00	95,0	None
3	2 Step Amplification	50*	00:15	95,0	None
			00:40	60,0	Reading

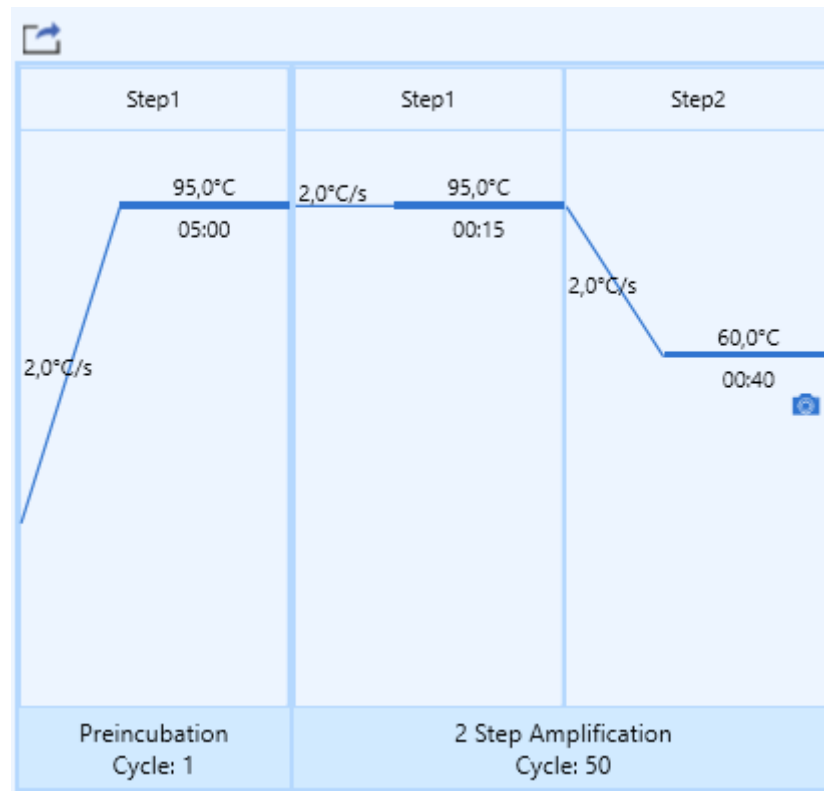
* – количество циклов при использовании наборов реагентов РН-042, РН-043, РН-045 можно сократить до 40

Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-029 «Рecto Dif-РВ»

Stage	Stage Type	Cycle	Time	Temperature	Fluorescence
1	Preincubation	1	05:00	95,0	None
2	2 Step Amplification	50	00:15	95,0	None
			00:40	62,0	Reading

Для ПЦР-РВ набора реагентов РН-100м «Globodera pallida и Globodera rostochiensis-РВ»

Stage	Stage Type	Cycle	Time	Temperature	Fluorescence
1	Preincubation	1	05:00	95,0	None
2	2 Step Amplification	45	00:15	95,0	None
			00:40	53,0	Reading



Пример заданной программы амплификации

7. Во вкладке **Experiment** выставить объем реакционной смеси 25 мкл (**Reaction Volume 25µL**)

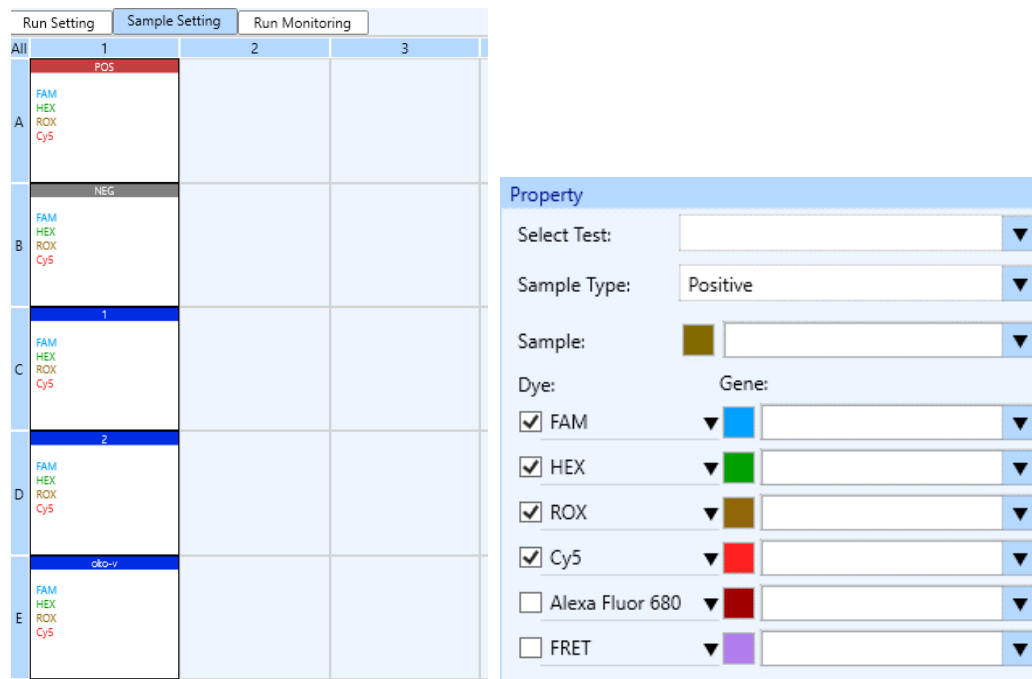
8. Перейти во вкладку **Sample Setting**

9. 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



• 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 плашке лунки со всеми исследуемыми пробирками (включая ПКО и ОКО) и поставить галочки в колонке **Dye** на красителях согласно *таблице 1*.

11. Прейти во вкладку **Run Monitoring** и в открывшемся окне нажать **Run**.

12. По завершении 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 ПО приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96» или эквивалентных им (см. п «**рекомендуемое измерительное оборудование**»). Критерием регистрации роста сигнала флуоресценции (наличие кинетической кривой роста сигнала флуоресценции) в ПО приборов является величина порогового цикла C_t , которая означает любую величину менее 50. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается ПО прибора, например, как предельная величина порогового цикла ($C_t \geq 50$ в приборах «АНК»), либо как ее отсутствие (N/A в приборах фирмы «BioRad») и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Обработка результатов ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ

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 красителем Green 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**» *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 СТ**» установить значение для пороговой линии «**Threshold/Порог**» – 0,05 и «**Eliminate cycles before/Исключить циклы до**» – 10.



***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 разделе **Интерпретация результатов анализа**.

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/Регрессия**. Для этого в меню **Settings/Настройки** выбрать **Cq Determination Mode/Режим определения Cq**→**Regression/Регрессия**.
3. Провести интерпретацию результатов, как описано в разделе **Интерпретация результатов анализа**.


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 завершить исследование 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 разделе **Интерпретация результатов анализа**.

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  **Показать настройки файла (Show Plot Settings)**. 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 разделе,

Интерпретация результатов анализа

Результаты анализа подлежат учету:

Полученный результат	Интерпретация результата
Отсутствие роста сигнала флуоресценции у образцов ОКО и ОКО-В по каналам специфичной реакции одновременно с регистрацией роста сигнала флуоресценции по каналу внутреннего положительного контроля (ВПК)	Результаты анализа подлежат учету, проводить дальнейшую интерпретацию согласно Таблице стр.73
Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирке с исследуемым образцом по каналу внутреннего положительного контроля (ВПК) одновременно с отсутствием сигнала по каналу специфичной реакции	
Регистрация роста сигнала флуоресценции ПКО по каналам специфичной реакции	
Регистрация роста сигнала флуоресценции в микропробирке с исследуемым образцом по каналу специфичной реакции свидетельствует о наличии в образце специфического фрагмента НК	

Результаты анализа не подлежат учету:

Полученный результат	Интерпретация результата
Отсутствие регистрации роста сигнала флуоресценции у образцов ОКО и ОКО-В по каналу внутреннего положительного контроля (ВПК)	ложноотрицательный результат всего эксперимента
Регистрация роста сигнала флуоресценции у образцов ОКО и/или ОКО-В по каналу специфичной реакции	ложноположительный результат всего эксперимента
Отсутствие регистрации роста сигнала флуоресценции в пробирке с исследуемым образцом по каналу внутреннего положительного контроля (ВПК) одновременно с отсутствием сигнала по каналу специфичной реакции	ложноотрицательный результат в конкретной пробирке
Отсутствие регистрации роста сигнала флуоресценции у образцов ПКО по каналу специфичной реакции	ложноотрицательный результат всего эксперимента
<i>При получении вышеуказанных результатов необходимо повторить эксперимент.</i>	

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу (Таблица 1)		Образец	Интерпретация
Специфичная реакция	Внутренний положительный контроль (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	Контаминация и ингибирование отсутствуют
		ОКО	
Отсутствие сигнала флуоресценции	Наличие сигнала флуоресценции	проба	В пробе не обнаружены НК исследуемого патогена
Наличие сигнала флуоресценции ≤40 циклу	Наличие/отсутствие сигнала флуоресценции		В пробе обнаружена НК исследуемого патогена

Возможные проблемы	Решение
<p>Наличие роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции у образцов ОКО и/или ОКО-В</p>	<p>Контаминация в лаборатории.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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. <p>Необходимо провести уборку помещения с хлорсодержащими моющими средствами и повторить эксперимент используя новый набор для проведения ПЦР-РВ.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 приступить к проведению экспериментов.

Возможные проблемы	Решение
Отсутствие роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции у образцов ПКО	<p>Необходимо повторить эксперимент удостоверившись в правильности проведения анализа:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Проверить что добавлены все реактивы согласно инструкции • Проверить правильность программы амплификации • Проверить правильно ли указаны каналы детекции флуоресценции (<i>Таблица 1</i>) • Проверить срок годности используемых реактивов
Отсутствие сигнала флуоресценции по каналам внутреннего положительного контроля (ВПК) у образцов ПКО, ОКО, ОКО-В	<p>Необходимо повторить эксперимент удостоверившись в правильности проведения анализа:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Проверить что добавлены все реактивы согласно инструкции • Проверить правильность программы амплификации • Проверить правильно ли указаны каналы детекции флуоресценции (<i>Таблица 1</i>) • Проверить срок годности используемых реактивов
Отсутствие сигнала флуоресценции по каналам внутреннего положительного контроля (ВПК) у исследуемых образцов (при условии наличия сигнала у контрольных образцов)	<p>1) Возможная ситуация: отсутствие сигнала флуоресценции по каналам внутреннего положительного контроля (ВПК) у исследуемых образцов с одновременным наличием сигнала флуоресценции, по ВСЕМ каналам специфичной реакции При такой ситуации результаты эксперимента считают достоверными</p> <p>2) Возможная ситуация: отсутствие сигнала флуоресценции по каналам внутреннего положительного контроля (ВПК) у исследуемых образцов с одновременным отсутствием сигнала флуоресценции, по любому из каналов специфичной 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.</p>
Начало роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции на 2-5 цикле	<p>При регрессионном анализе появляются кривые флуоресценции с некорректной формой (не S-образные) на 2-5 циклах. Причина такого результата особенности работы оптической систем прибора и алгоритмов обсчета данных. При возникновении подобной ситуации рекомендуем проводить анализ с использованием пороговой линии.</p>

Возможные проблемы	Решение
<p>Наличие сигнала флуоресценции, по каналам специфичной реакции, присутствует у всех образцов и совпадает с пороговыми циклами внутреннего положительного контроля</p>	<p>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.</p>
<p>Начало роста сигнала флуоресценции по каналам специфичной реакции наблюдается на 40 + циклах</p>	<p>1) При диагностике вирусных инфекций: Поздние циклы не характерны для вирусов. Так, 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.</p> <p>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 подращивания бактерий. Последующую ПЦР-РВ рекомендуем провести в двойном повторе.</p> <p>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.</p> <p>В случае повторного получения описанных результатов даже при использовании вышеуказанных рекомендаций Вы можете направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол».</p>

Пример диагностики растительного материала на наличие нуклеиновых кислот фитопатогенов

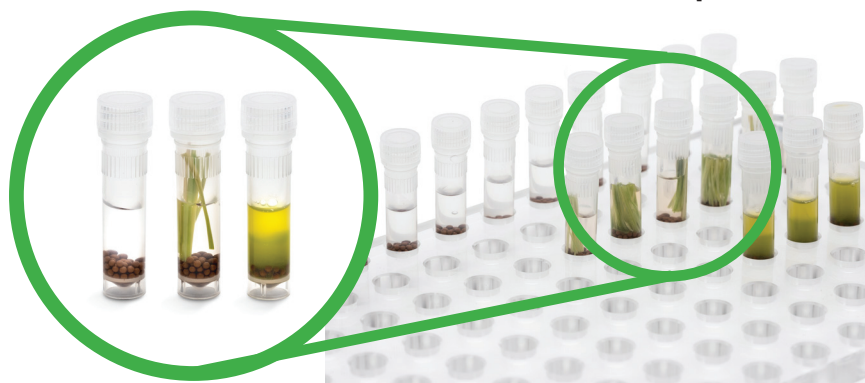
1. Подготовка материала для анализа. Навеску образцов и последующий метод выделения НК выбирается согласно инструкциям к наборам реагентов, а также рекомендациям ЕРРО и ВНИИКР.



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 (проводится 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:

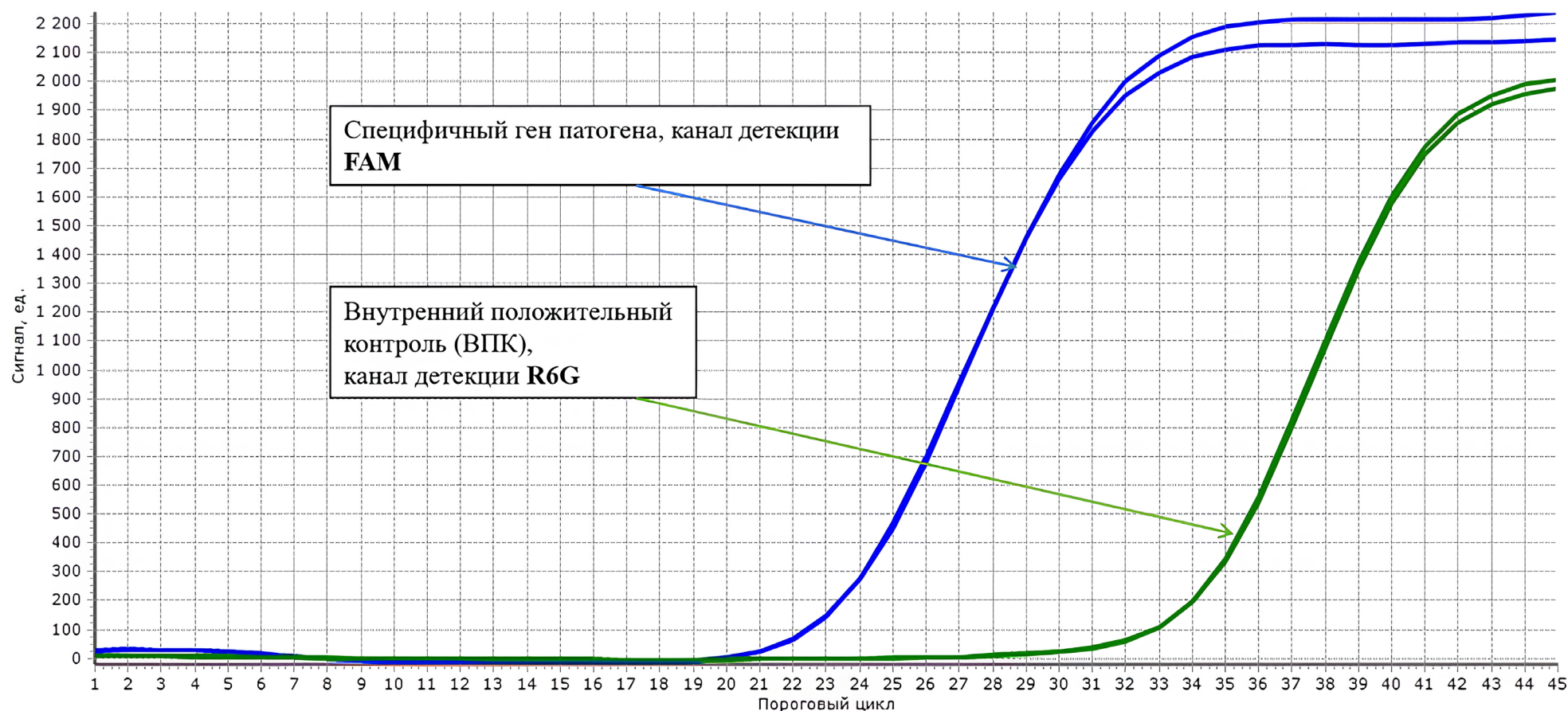
- **АНК-32 (32М, 48)** (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия)
- **CFX-96** (BioRad, США)
- **Rotor Gene Q/6000** (Qiagen/Corbett, США/Австралия)
- **ДТпрайм/ДТлайт** («ДНК-технология», Россия)
- **QuantStudio 5** (Thermo Fisher Scientific, США).
- **Gentier 96E** (Xi'an Tianlong Technology Co., Ltd, Китай)

6. **Полученные результаты** интерпретируют согласно разделу **Обработка результатов ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ**

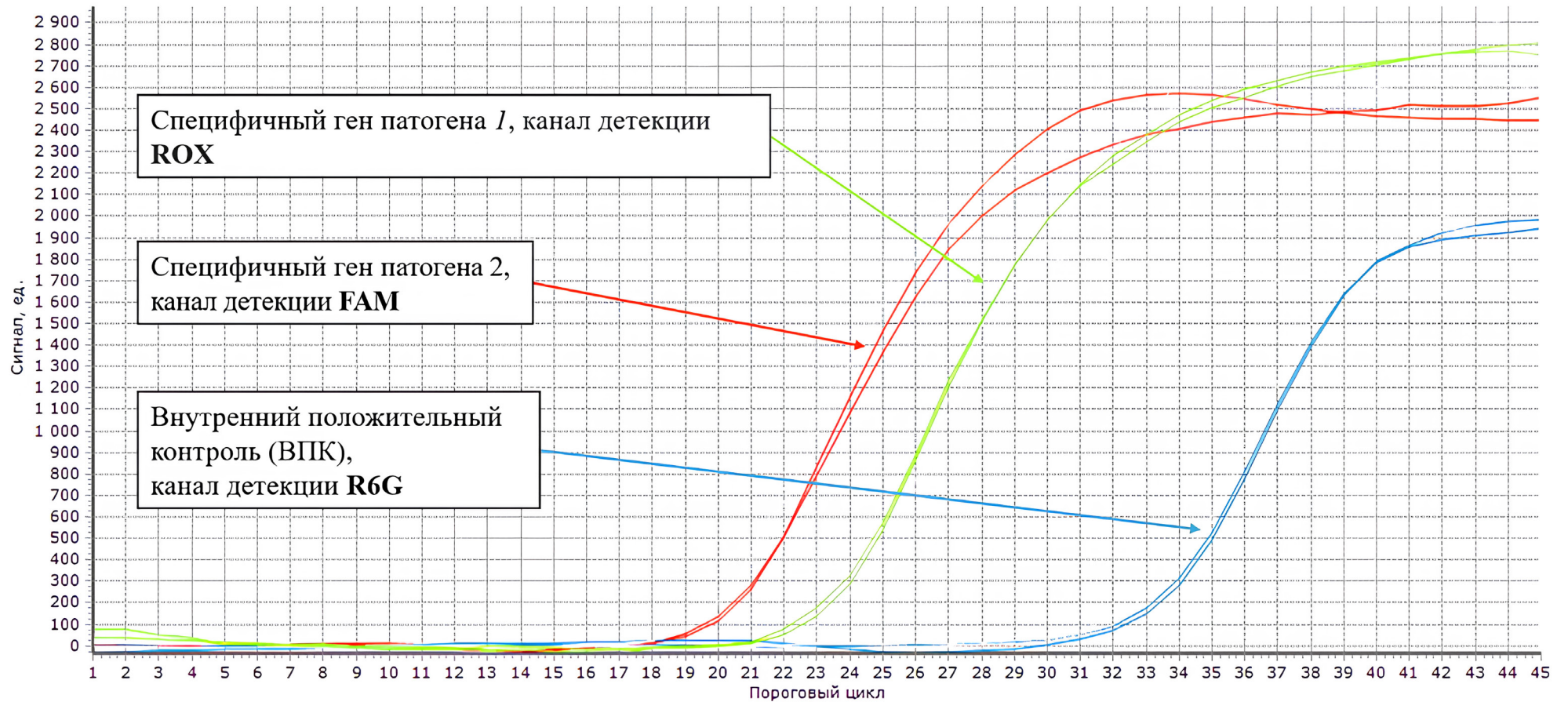
Примеры результатов ОТ-ПЦР-РВ/ПЦР-РВ анализа на приборах разных производителей:

«АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия)

Пример двухканальной системы



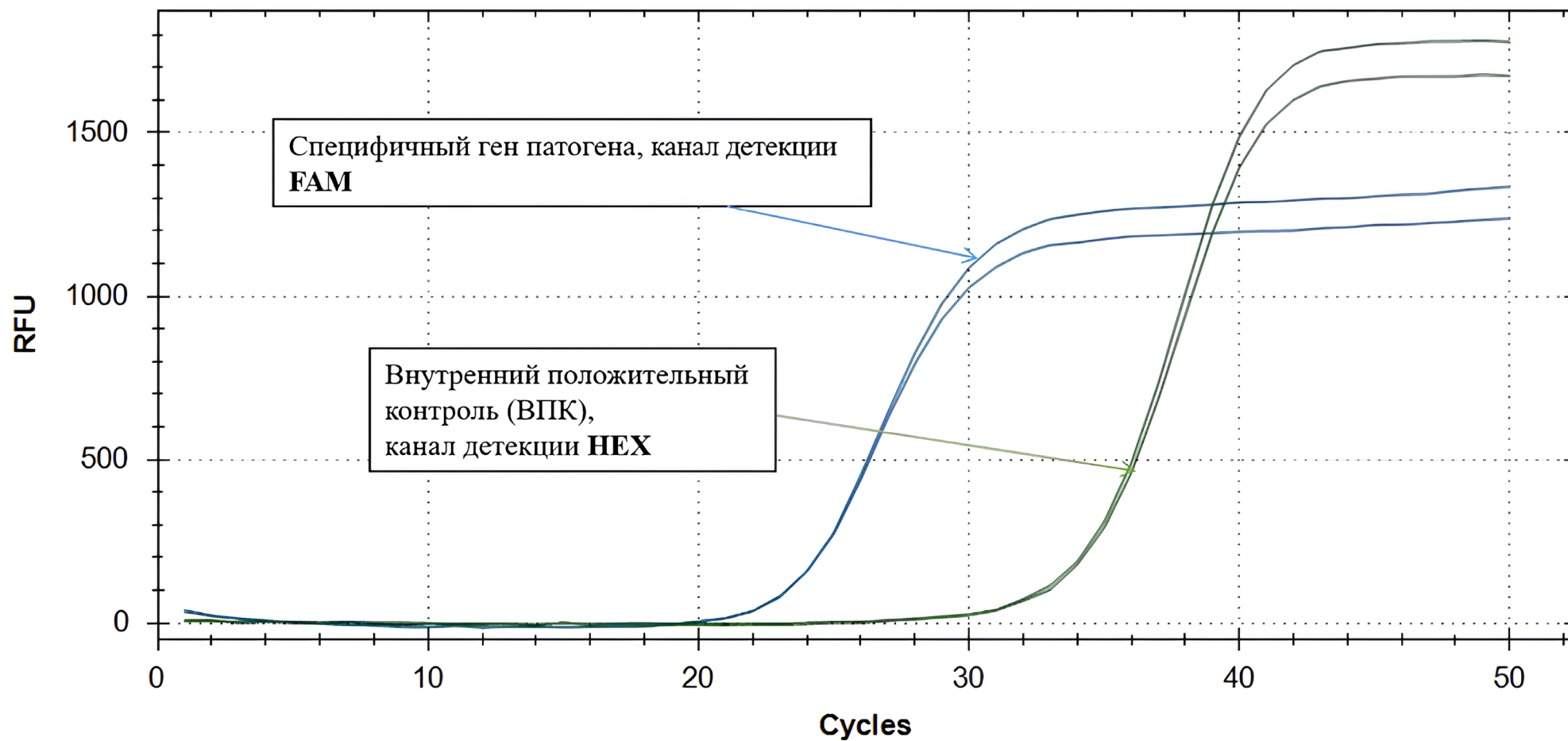
Пример трехканальной системы



«CFX-96» («BioRad», США)

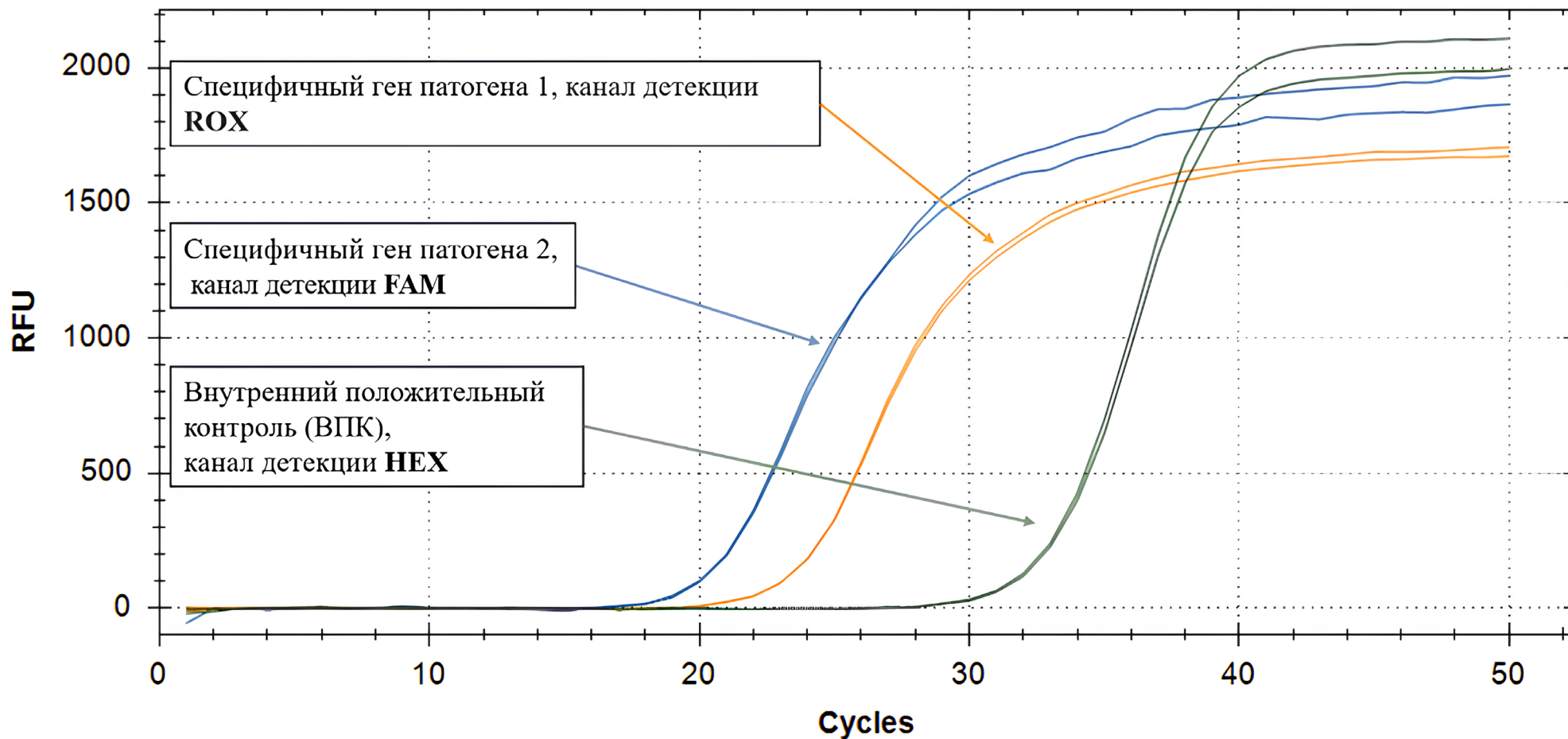
Пример двухканальной системы

Amplification



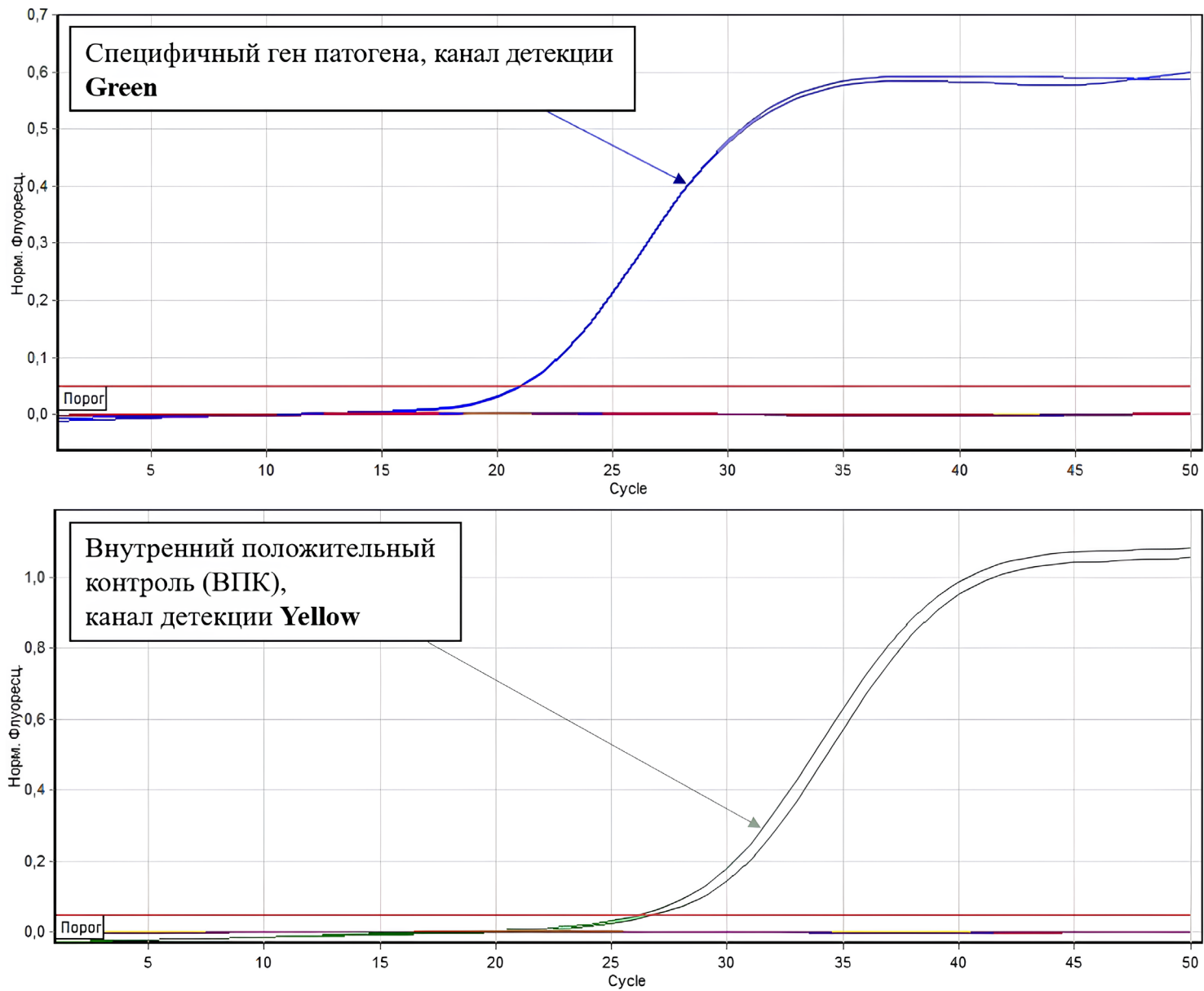
Пример трехканальной системы

Amplification

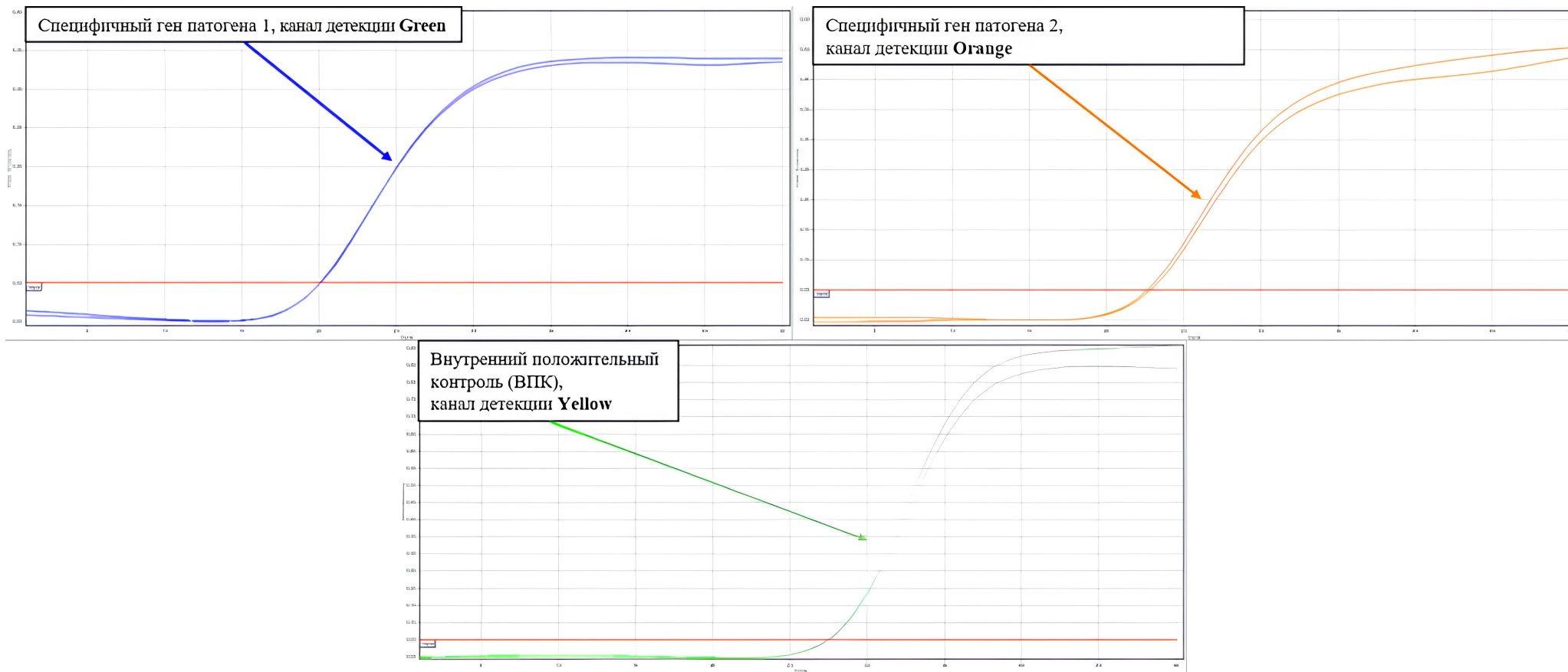


«Rotor Gene Q/6000» (Qiagen/Corbett, США/Австралия)

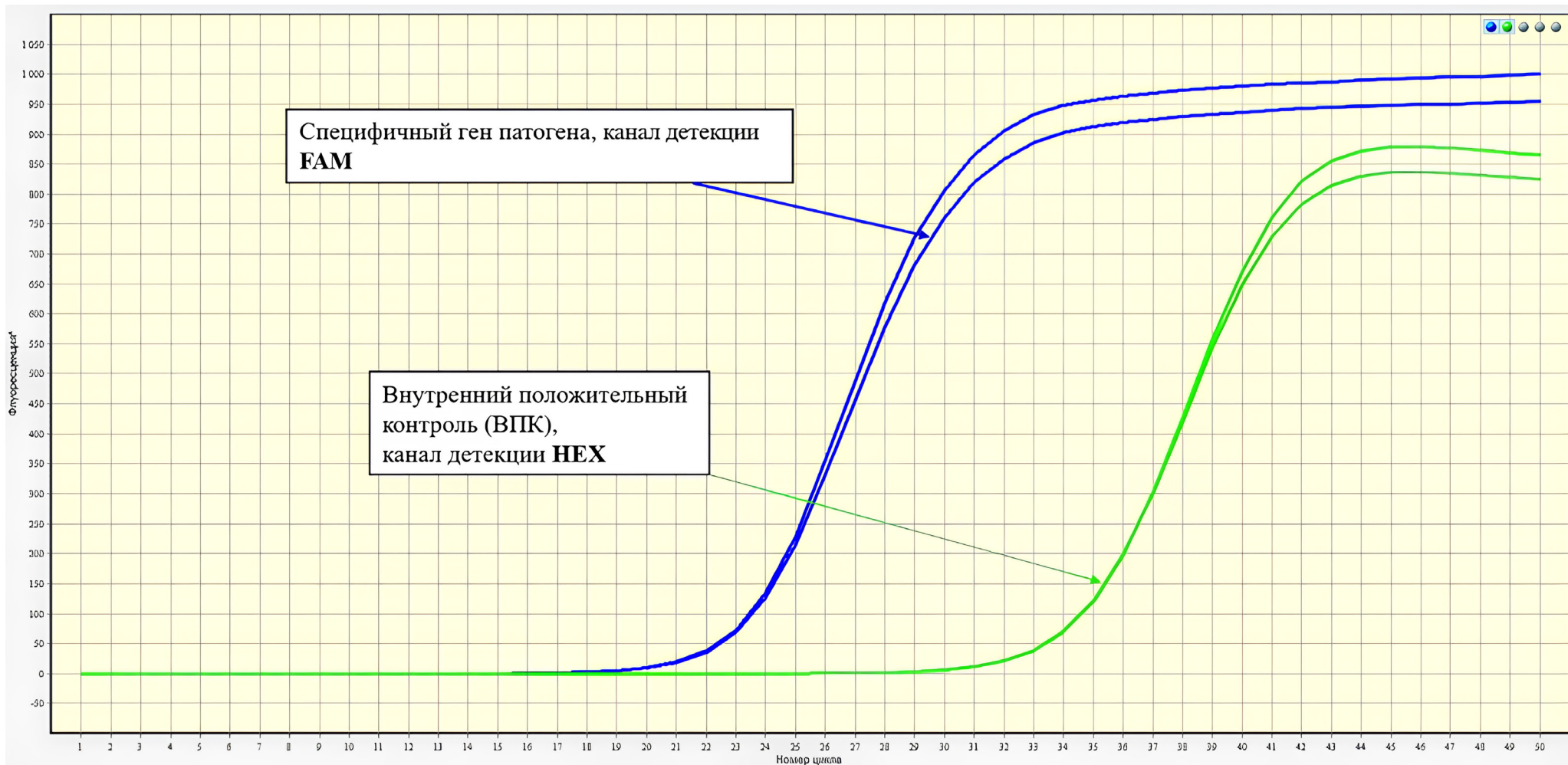
Пример двухканальной системы



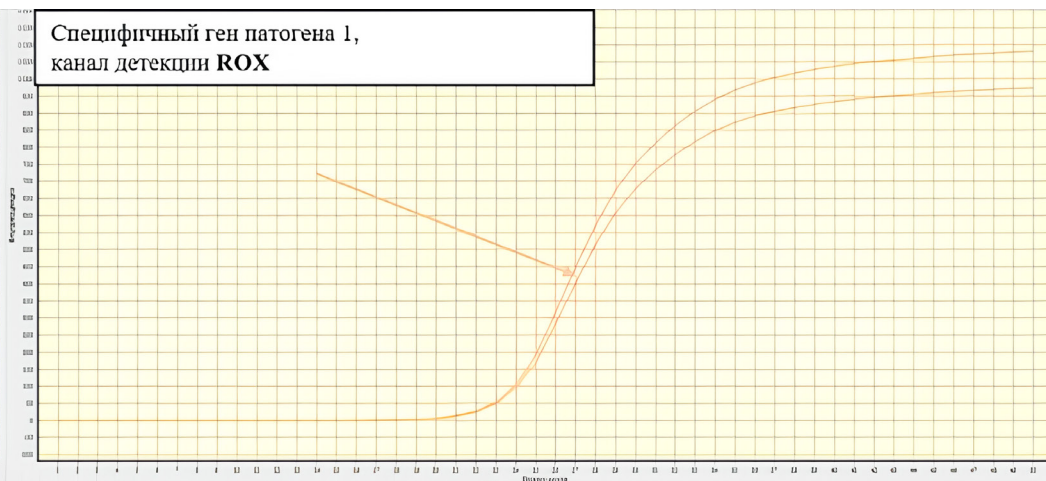
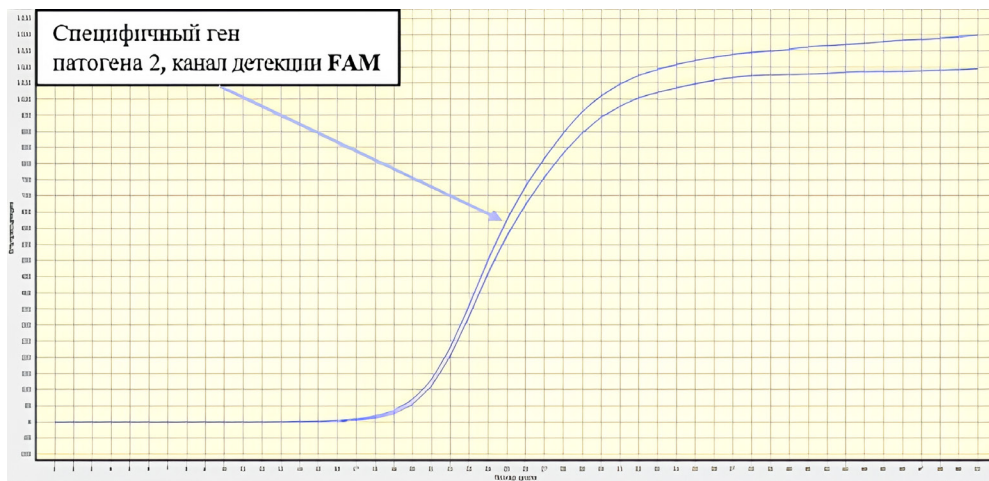
Пример трехканальной системы



Пример двухканальной системы

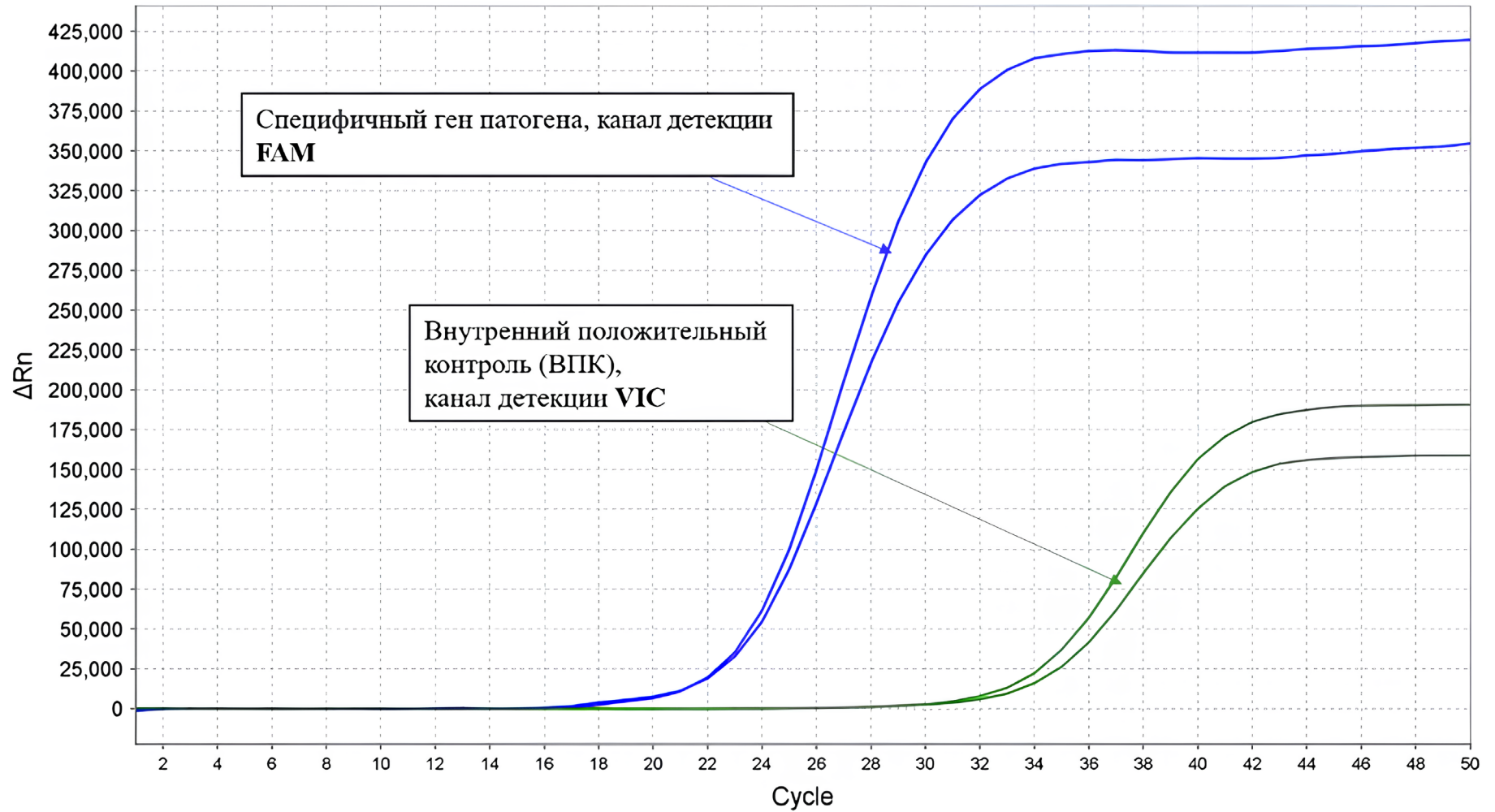


Пример трехканальной системы



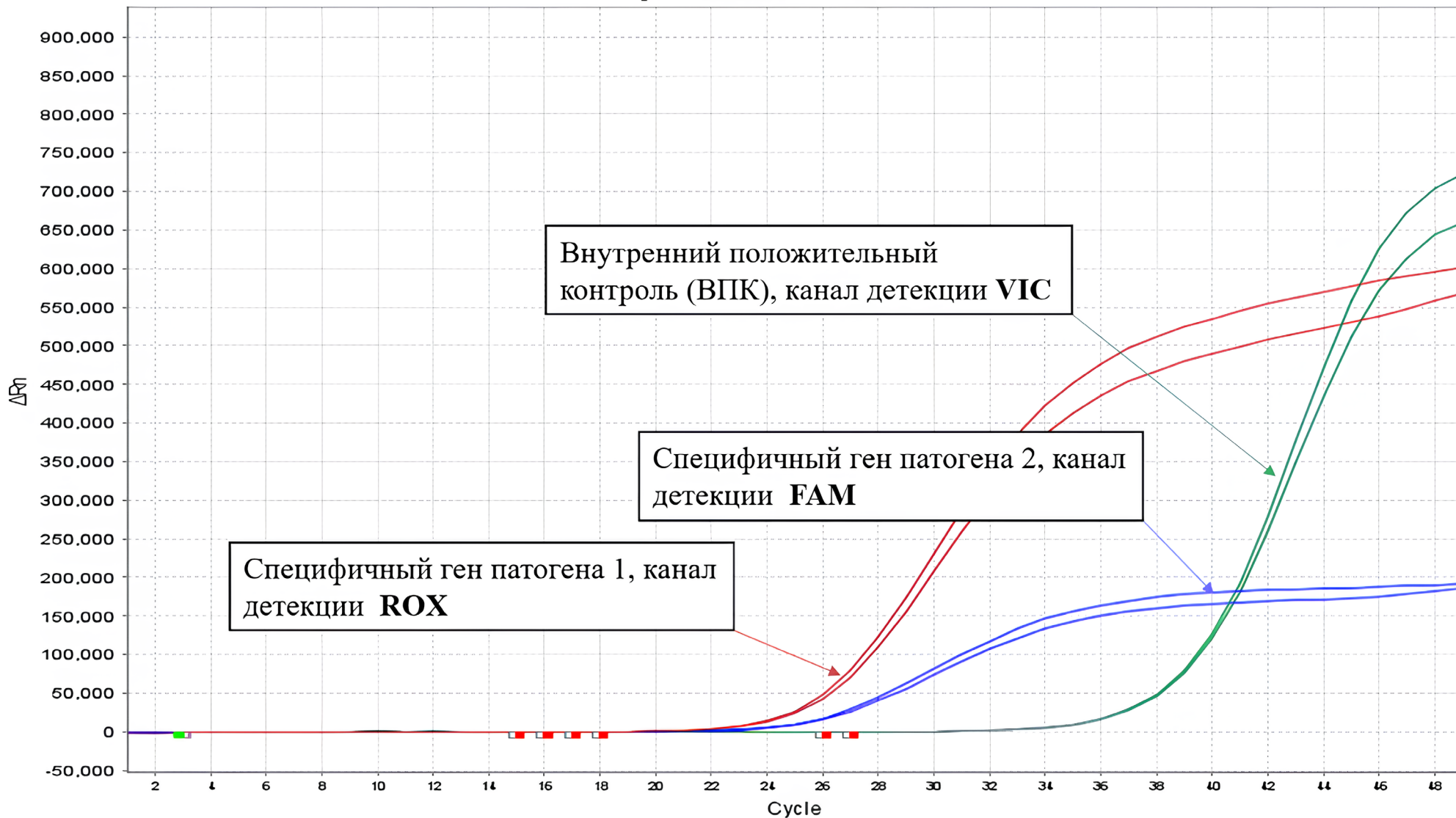
Пример двухканальной системы

Amplification Plot



Пример трехканальной системы

Amplification Plot

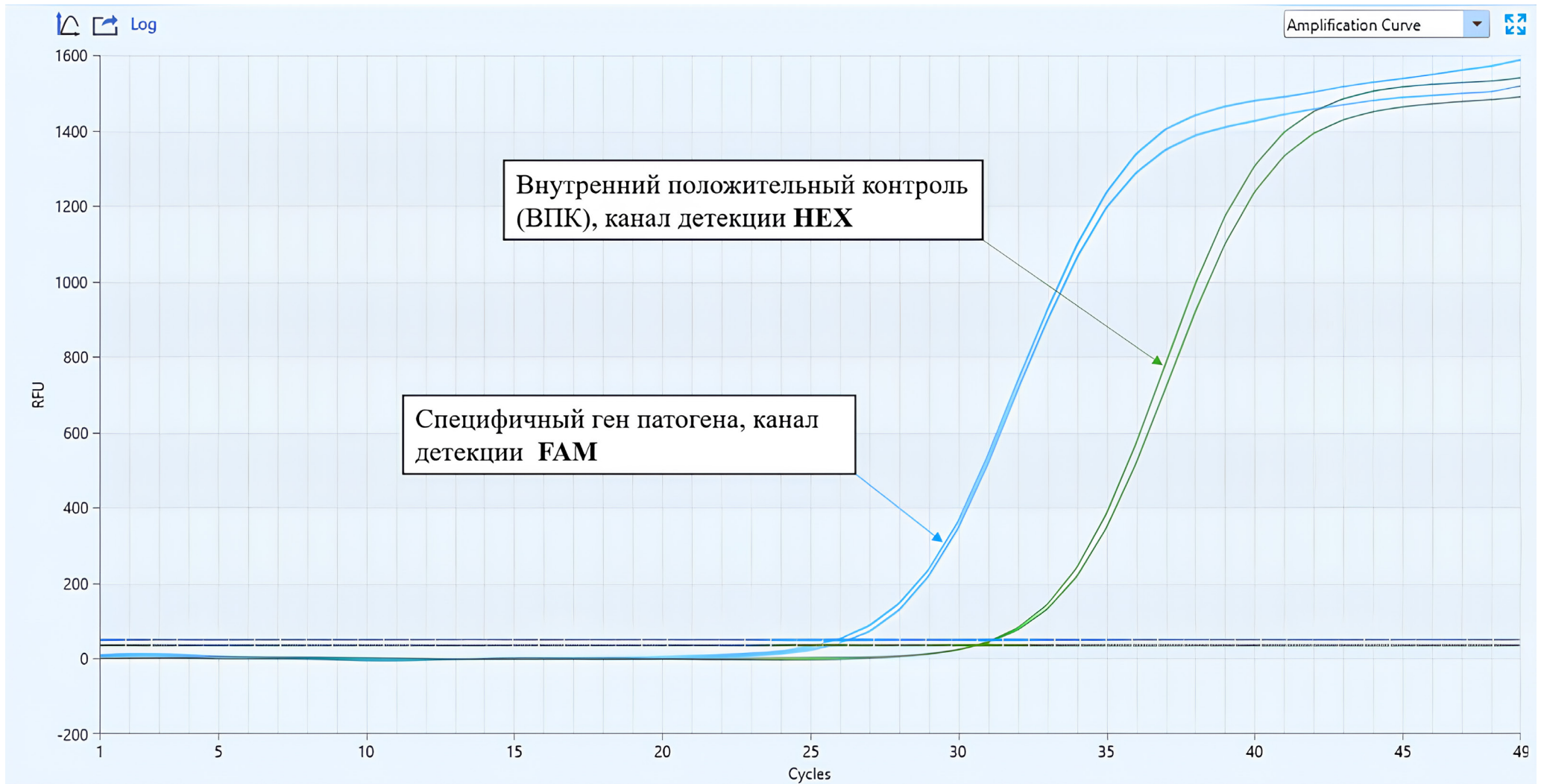


Внутренний положительный контроль (ВПК), канал детекции VIC

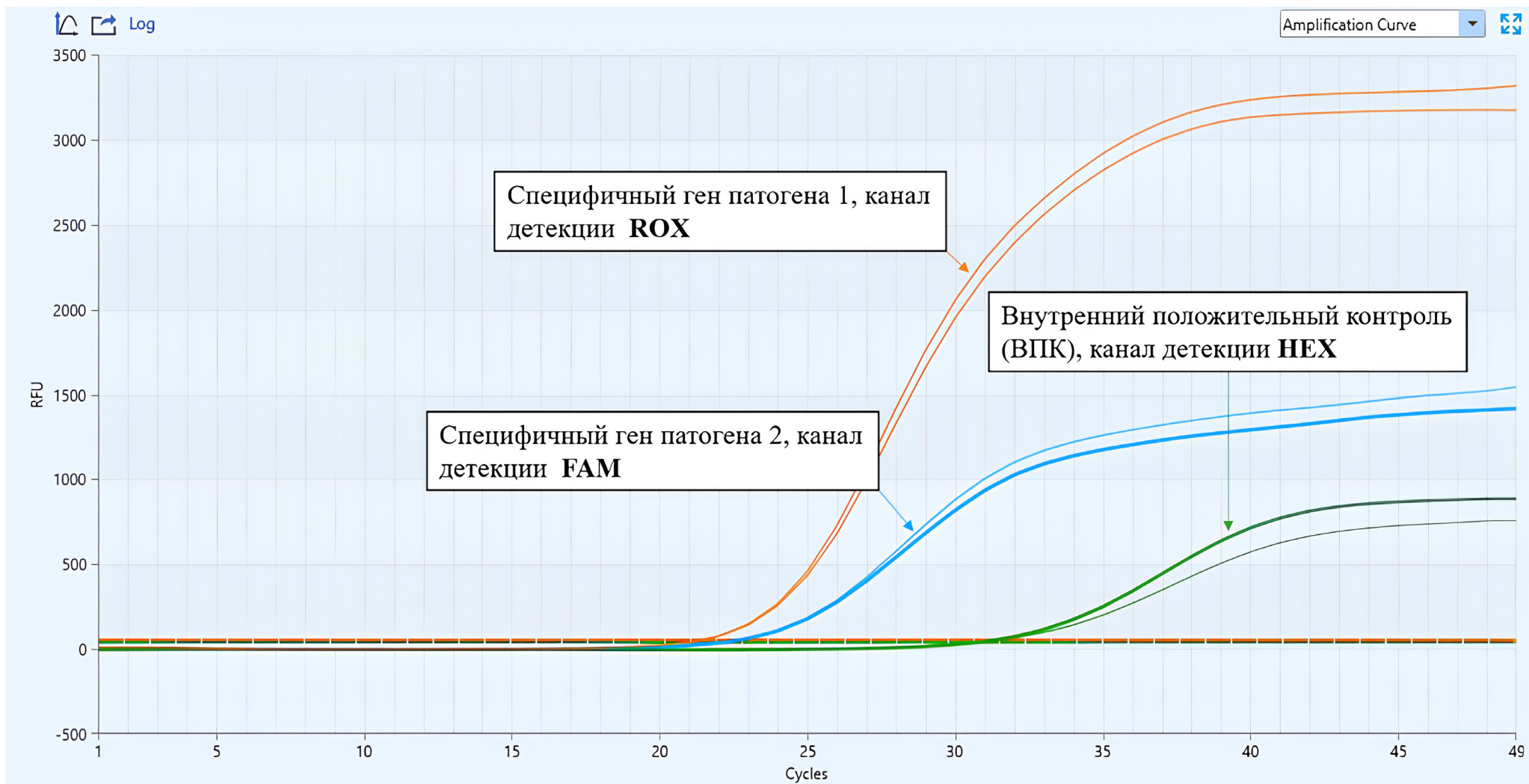
Специфичный ген патогена 2, канал детекции FAM

Специфичный ген патогена 1, канал детекции ROX

Пример двухканальной системы



Пример трехканальной системы



Приложение А

Наборы реагентов для выявления фитопатогенов

Кат. №	Название набора	Назначение набора
PH-500	Экстрагирующий буфер (PBS)	
PH-520	«Фитосорб»	Для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала (на магнитных частицах)
PH-523	«Фитосорб-П»	Для выделения НК из растительного материала с пробирками для гомогенизации (на магнитных частицах)
PH-521	«Фитосорб-Автомат-24»	Для автоматического выделения нуклеиновых кислот из растительного материала на роботизированных станциях TECAN
PH-522	«Фитосорб-Автомат-48»	Для автоматического выделения нуклеиновых кислот из растительного материала на роботизированных станциях TECAN
PH-524new	«Фитоскрин-Экспресс»	Для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях kingfisher Flex System и/или их аналогах
PH-526	«Фитоскрин-Экспресс-П»	Для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или/и 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 дифференциальной диагностики и выявления ДНК <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> и <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i> (возбудителя заболевания картофеля “черная ножка”)

Наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот

Кат. №

Название набора

Назначение набора

Наборы реагентов для обнаружения патогенов КАРТОФЕЛЯ

Бактерии:

PH-001	«Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus-PB»	Для выявления ДНК возбудителя кольцевой гнили картофеля
PH-002*	«Ralstonia solanacearum (раса 3, bv.2)-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бурой гнили картофеля
PH-012	«Ralstonia solanacearum (раса 3, bv.2), Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicum-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК возбудителя бурой и кольцевой гнили картофеля
PH-019*	«Candidatus Liberibacter solanacearum-PB»	Для выявления ДНК возбудителя заболевания картофеля “Зебра чипсов”
PH-008	«Dickeya-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК D. Solani и D. Dianthicola (возбудителей заболевания картофеля “черная ножка”)
PH-020	«Candidatus Phytoplasma solani-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины
PH-031	«Dickeya spp-PB»	Для выявления возбудителей заболевания картофеля “черная ножка”
PH-032	«Pectobacterium spp-PB»	Для выявления ДНК возбудителей заболевания картофеля “черная ножка”
PH-044	«Pectobacterium wasabiae+ Pectobacterium atrosepticum-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК возбудителей заболевания картофеля “черная ножка”
PH-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 “черная ножка”)

Нематоды:		
PH-100м*	«Globodera pallida и Globodera rostochiensis-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК бледной и золотистой нематоды
PH-103	«Ditylenchus destructor-PB»	Для выявления ДНК стеблевой нематоды картофеля
Грибы:		
PH-052	«Stagonosporopsis andigena-PB»	Для выявления ДНК возбудителя фомозной пятнистости листьев картофеля
PH-009*	«Synchytrium endobioticum-PB»	Для выявления ДНК возбудителя рака картофеля
Вирусы и вириды:		
PV-001	«Potato Virus X и Potato Virus Y-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-PB
PV-002	«Potato Virus M и Potato Leafroll Virus-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-PB
PV-003	«Potato Virus S и Potato Virus A-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-PB
PV-004*	«Potato spindle tuber viroid-PB»	Для выявления РНК вириды веретеновидности клубней картофеля методом ОТ-ПЦР-PB
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-PB
PV-012*	«Andean potato latent virus-PB»	Для обнаружения РНК андийского латентного вируса картофеля методом ОТ-ПЦР-PB
PV-013	«Potato Virus M, Potato Virus Y, Potato Virus S-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-PB
PV-036*	«Potato black ringspot virus-PB»	Для выявления РНК вируса черной кольцевой пятнистости картофеля методом ОТ-ПЦР-PB

Наборы реагентов для обнаружения патогенов ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

PH-006*	«Acidovorax citrulli-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур
PH-010*	«Beet necrotic yellow vein virus-PB»	Для выявления РНК вируса некротического пожелтения жилок сахарной свеклы (ризомания сахарной свеклы) методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-018*	«Tomato yellow leaf curl disease-PB»	Для выявления ДНК бегомовирусов, возбудителей болезни желтой курчавости листьев томата
PH-028*	«Tomato ringspot virus-PB»	Для выявления РНК вируса кольцевой пятнистости томата методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-041	«Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального рака томата
PH-042	«Tomato spotted wilt virus-PB»	Для выявления РНК вируса бронзовости томата методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-043	«Tomato brown rugose fruit virus-PB»	Для выявления РНК вируса коричневой морщинистости плодов томата методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-045	«Pepino mosaic virus-PB»	Для выявления РНК вируса мозаики пепино методом ОТ-ПЦР-РВ

Наборы реагентов для обнаружения патогенов ВИНОГРАДА

PH-005*	«Xylophilus ampelinus-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального увядания винограда
PH-007*	«Xylella fastidiosa-PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериоза винограда (болезнь Пирса)
PH-020	«Candidatus Phytoplasma solani-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины
PH-023*	«Candidatus Phytoplasma vitis-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы золотистого пожелтения винограда
PH-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

PH-004*	« <i>Pantoea stewartii</i> -PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального вилта кукурузы
PH-025*	« <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> -PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериального ожога риса
PH-035*	« <i>Cercospora kikuchii</i> -PB»	Для выявления ДНК возбудителя пурпурного церкоспороза сои
PH-017	«Barley yellow dwarf virus-PB»	Для выявления РНК вируса жёлтой карликовости ячменя методом ОТ-ПЦР-PB
PH-034	«Barley stripe mosaic virus-PB»	Для выявления РНК вируса штриховатой мозаики ячменя методом ОТ-ПЦР-PB
PH-038	« <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> -PB»	Для выявления ДНК возбудителя ржаво-бурой пятнистости листьев фасоли
PH-039	« <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> -PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериальной гнили влагалища листа пшеницы
PH-040*	«Tobacco ringspot virus-PB»	Для выявления РНК вируса кольцевой пятнистости табака методом ОТ-ПЦР-PB
PH-046	« <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> -PB»	Для выявления ДНК возбудителя бактериальной полосатости риса
PH-049	«Wheat streak mosaic virus-PB»	Для выявления РНК вируса полосатой мозаики пшеницы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР-PB)
PH-053	« <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i> -PB»	Для выявления возбудителя бактериального ожога гороха
PH-054*	« <i>Tilletia controversa</i> -PB»	Для выявления возбудителя карликовой головни пшеницы
PH-055*	« <i>Tilletia indica</i> -PB»	Для выявления возбудителя индийской головни пшеницы

Наборы реагентов для обнаружения патогенов МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР

PH-047*	« <i>Diaporthe helianthi</i> -PB»	Для выявления ДНК возбудителя фомопсиса подсолнечника
---------	-----------------------------------	-------------------------------------------------------

Наборы реагентов для обнаружения патогенов ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

PH-021*	«Candidatus Phytoplasma mali-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы пролиферации яблони
PH-022*	«Candidatus Phytoplasma pyri-PB»	Для выявления ДНК фитоплазмы истощения груши
PH-024*	«Monilinia-PB»	Для дифференциальной диагностики и выявления ДНК <i>Monilinia fructicola</i> , а также <i>Monilinia fructigena</i> , <i>polystroma</i> и <i>laxa</i>
PH-003*	«Erwinia amylovora-PB»	Для выявления ДНК возбудителя ожога плодовых деревьев
PH-011*	«Plum pox potyvirus-PB»	Для выявления РНК вируса шарки (оспы) сливы методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-014	«Prunus necrotic ring spot ilarvirus-PB»	Для выявления РНК иларвируса некротической кольцевой пятнистости косточковых методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-015	«Prune dwarf ilarvirus-PB»	Для выявления РНК иларвируса карликовости сливы методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-030*	«Colletotrichum acutatum complex-PB»	Для выявления ДНК грибов видового комплекса <i>Colletotrichum acutatum</i>
PH-037*	«Raspberry ringspot nepovirus-PB»	Для выявления РНК вируса кольцевой пятнистости малины методом ОТ-ПЦР-РВ (готовая лиофилизированная ПЦР-смесь в стрипованных ПЦР-пробирках)
PH-048	«Candidatus Phytoplasma sp.-PB»	Для выявления ДНК группы фитоплазм <i>Candidatus Phytoplasma</i> методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)

Наборы реагентов для обнаружения ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ

PH-013*	«Impatiens necrotic spot virus-PB»	Для выявления РНК вируса некротической пятнистости бальзамина методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-027*	«Chrysanthemum stunt pospoviroid-PB»	Для выявления РНК вириода карликовости хризантем методом ОТ-ПЦР-РВ
PH-051*	«Stagonosporopsis chrysanthemi-PB»	Для выявления ДНК возбудителя аскохитоза хризантем

Наборы реагентов для обнаружения ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

PH-102*	«Bursaphelenchus xylophilus-PB»	Для выявления ДНК сосновой стволовой нематоды
PH-050*	«Phytophthora ramorum-PB»	Для выявления ДНК возбудителя фитофтороза древесных и кустарниковых культур

* Карантинный патоген растений

Список сокращений

В настоящих методических рекомендациях применены следующие сокращения:

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

Методические рекомендации для диагностики фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени подготовлены на основе исследований, проведенных ООО «НПФ Синтол» в составе: Кузубов А.В., Алексеев Я.И., Шварцев А.А., Конышева М.Л., Савинова С.А.



ООО «НПФ Синтол»

127434, Москва, Тимирязевская 42,
т: (495) 984 6993, т/ф: (499) 977 7455

e-mail: syntol@syntol.ru

www.syntol.ru