

**Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот
из растительного материала
«ФитоСорб-П»**

ИНСТРУКЦИЯ по применению

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала «ФитоСорб-П».

1.2 Назначение

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

1.3 Область применения

Область применения набора – лабораторная диагностика фитопатогенов, научные исследования. Набор может быть использован в лабораторных центрах и институтах, проводящих контроль фитосанитарного состояния растений, в том числе посадочного материала, в целях обнаружения РНК/ДНК фитопатогенов.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ФитоСорб-П» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

2.1.1 Набор реагентов «ФитоСорб-П»

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала «ФитоСорб-П» рассчитан на 50 выделений при автоматической гомогенизации.

№	Реагент	Описание	Объем, мл	Количество, шт
1	Пробирки с шариками для гомогенизации и экстрагирующим буфером	Шарики для гомогенизации в бесцветной прозрачной жидкости	0,7	50
2	Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1
3	Сорбирующий раствор	Суспензия магнитных частиц темно-коричневого цвета	1,5	2
4	Осаждающий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1
5	Промывочный раствор 1	Прозрачная бесцветная жидкость	60	1
6	Промывочный раствор 2	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1
7	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	12	1
	Деионизованная вода (ddH ₂ O)	Прозрачная бесцветная жидкость	1,7	2

2.2 Ограничения

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 ГО-СТами 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.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

3.1 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.

3.2 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.

Компоненты набора осаждающий и промывочный растворы (реагенты 5, 7) содержат легковоспламеняющиеся жидкости. Все работы с легковоспламеняющимися жидкостями должны проводиться с использованием приточно-вытяжной вентиляции, вдали от огня и источников искрообразования, электрооборудование и освещение должно быть взрывобезопасно.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в шкафу биологической безопасности (ШББ) 2 класса (например, БМБ-II-«Ламинар-С-1,5», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

4.2 Дозирующие устройства

Набор автоматических (механических) пипеток переменного объема на 20-200 мкл и 100-1000 мкл;

штатив для данных пипеток.

4.3 Другое используемое оборудование

4.3.1 Для подготовки образцов (гомогенизации) к выделению НК

Автоматическая гомогенизация

Ротационный гомогенизатор Precellys Evolution (IBertintechnologies, Франция) или аналогичный.

4.3.2 Для выделения ДНК/РНК

Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-100 °С для пробирок объемом 1,5-2 мл (например, «Циклотемп-303»);

центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5424);

микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901»);

отсасыватель медицинский (например, ОМ-1);

штативы для наконечников;

магнитный штатив для микропробирок объемом 1,5 и 2 мл (например, «М-24», Синтол)

4.4 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

4.5 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

4.5.1 Для подготовки образцов (гомогенизации) к выделению НК

Стерильные одноразовые пинцеты;

микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

4.5.2 Для выделения НК

Микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

одноразовые пипетки Пастера объемом 1-3,5 мл (при отсутствии отсасывателя медицинского);

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без аэрозольного барьера до 1000 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

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

Рекомендованные количества образца^{1,2}

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг
	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.

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

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.

5.1 Предварительная подготовка биологического материала

5.1.1 Автоматическая гомогенизация

1. Поместить исследуемый растительный образец (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») в **пробирку с шариками для гомогенизации и экстрагирующим буфером (реагент №1)** 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 не достаточной гомогенизации необходимо повторить пункт 2 этапа **Пробоподготовка Автоматическая гомогенизация**.

5.2 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.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед выделением следует убедиться в отсутствии осадка в реагенте №2. В случае наличия осадка необходимо нагреть раствор до 30-60 °С до полного растворения осадка.

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (**ОКО-В**) (1 на 5 исследуемых образцов), который потом обязательно анализируется в ПЦР вместе с другими образцами. Это позволит контролировать возможную контаминацию на этапе выделения ДНК/РНК.

6.1. Лизис

1. Во время центрифугирования подготовить и промаркировать новые 1,5 мл пробирки.

2. Добавить 500мкл **лизирующего раствора (реагент №2)** в каждую пробирку для исследуемого образца и **ОКО-В**.

3. Отобрать 500 мкл супернатанта после центрифугирования образцов и перенести в подготовленные 1,5 мл пробирки, содержащие лизирующий раствор. В пробирки для **ОКО-В** добавить 500 мкл деинизованной воды.

Примечание: в случае, если объем супернатанта меньше, чем 500 мкл, объем образца может быть уменьшен до 300 мкл.

4. Интенсивно перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировать при 65°С 10 минут в термостате, перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждую минуту.

5. Вынуть пробирки из термостата и остудить пробирки при комнатной температуре. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин 5 минут.

6.2. Сорбция и осаждение НК

1. Во время центрифугирования подготовить и промаркировать чистые пробирки объемом 1,5 мл и внести в каждую по 60 мкл **сорбирующего раствора (реагент №3)**.

Примечание: перед внесением, сорбирующий раствор тщательно ресуспендировать на микроцентрифуге-встряхивателе.

2. После центрифугирования, не задевая осадок, отобрать (используя отдельные наколечники с аэрозольными барьерами) 600 мкл супернатанта и перенести в подготовленные 1,5 мл пробирки.

3. Добавить в каждую пробирку 500 мкл **осаждающего раствора (реагент №4)**.

4. Тщательно перемешать содержимое пробирок до равномерного распределения сорбента, выдержать 5 мин. при комнатной температуре, перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждую минуту.

5. Центрифугировать пробирки при 4000 об/мин 1 минуту.

6. Установить пробирки в магнитный штатив на 1 минуту.

7. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент**.

6.3. Промывка НК

1. Добавить к сорбенту 500 мкл **промывочного раствора 1 (реагент №5)** и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе до полного разрушения конгломерата магнитных частиц.

Примечание: при слипании сорбента необходимо разрушить конгломерат магнитных частиц с помощью микроцентрифуге-встряхивателя, интенсивность перемешивания может быть увеличена, однако необходимо избегать механического повреждения пробирок.

2. Центрифугировать пробирки при 4000 об/мин 1 минуту.

3. Установить пробирки в магнитный штатив на 1 минуту.

4. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент**.

5. Повторить пункты 1-4 этапа **Промывка НК** еще один раз.

6. Добавить к сорбенту 300 мкл **промывочного раствора 2 (реагент №6)** и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе до полного разрушения конгломерата магнитных частиц.

7. Центрифугировать при 4000 об/мин 1 минуту.

8. Установить пробирки в магнитный штатив на 1 минуту.

9. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент**.

10. Установить пробирки с открытыми крышками в термостат. Инкубировать 5-10 минут при 65°C до полного испарения промывочного раствора.

11. Через 5 минут начать проверку пробирок с сорбентом на степень высушивания. Для этого каждую пробирку закрывают и вынимают из термостата. Если чувствуется запах ацетона, то пробирки необходимо снова установить в термостат для продолжения сушки с открытыми крышками до 10 минут.

6.4. Элюция НК

1. Вынуть пробирки с полностью высохшим сорбентом из термостата.

2. Добавить 120 мкл **элюирующего раствора (реагент №7)** в пробирки с высушенным сорбентом.

3. Перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента.

4. Инкубировать при 65°C 5 минут в термостате, перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждую минуту.

5. Вынуть пробирки из термостата.

6. Центрифугировать при 13000 об/мин 1 минуты.
7. Установить пробирки в магнитный штатив на 1 минуту.
8. Подготовить чистые 1,5 мл пробирки и промаркировать их.
9. Перенести 100 мкл супернатанта в чистые 1,5 мл пробирки в соответствии с маркировкой, **не задевая сорбент**.

Примечание: в случае забора сорбента рекомендуется повторить пункты 6-9 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.).

6.5. Условия хранения выделенных образцов НК

Раствор ДНК может храниться при температуре от 2 до 8°C в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

Раствор РНК может храниться при температуре не выше минус 18°C в течение 6 месяцев, и в течение года при температуре минус 78°C.

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

7.1 Условия хранения

Набор реагентов «ФитоСорб-П» хранить в сухом защищенном от света месте при температуре +18-+25;

7.2 Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов «ФитоСорб-П» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С.

7.3 Срок годности

Срок годности составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

7.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации, согласно требованиям, СанПиН 2.1.3684-21.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

7.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ФитоСорб-П» направлять на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол» (125499, Москва, Кронштадтский бульвар, д. 39, к.1., пом 1 ком. 43/РМ 12-3, тел. (495)984-69-93, факс. (499)977-74-55, E. mail: syntol@syntol.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО

«НПФ Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Дата последней редакции: 09.12.2025.