

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

ИНСТРУКЦИЯ по применению

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название

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

1.2 Назначение

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

2.1 Состав набора

2.1.1 Набор реагентов «ФитоСорб»

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

№	Реагент	Описание	Объем, мл	Количество, шт
1	Экстрагирующий буфер (PBS)	Прозрачная бесцветная жидкость	250	1
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	Прозрачная бесцветная жидкость	1,7	2

2.2 Ограничения

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 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

Ручная гомогенизация без применения жидкого азота:

Стерильные ступки и пестики для гомогенизации растительного материала;

весы с точностью от 0,01 г;

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);

штативы для микропробирок на 1,5 мл;

холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов).

Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

Стерильные ступки и пестики для гомогенизации растительного материала;

весы с точностью от 0,01 г;

сосуд Дьюара;

термос (для временного хранения жидкого азота);

штативы для микропробирок на 1,5 мл;

холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов).

Пробоподготовка при выделении НК из водных гомогенных образцов

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»)

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
	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.

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

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

5.1 Предварительная подготовка биологического материала

Перед выделением следует убедиться в отсутствии осадка в реагенте №1. В случае наличия осадка необходимо нагреть раствор до 25-30 °С и обязательно перемешать плавным переворачиванием до полного растворения осадка.

5.1.1 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 (**реагент №1**).
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы
4. Добавить еще 2 мл экстрагирующего буфера (**реагент №1**) 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.

5.1.2 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 (**реагент №1**) 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 избежании контаминации после проведения ручной гомогенизации необходимо обрабатывать ступки и пестики дезинфицирующим хлорсодержащим средством.

5.1.3 Пробоподготовка при выделении НК из водных гомогенных образцов

1. Добавить в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки 500 мкл экстрагирующего буфера (**реагент №1**).
2. В пробирки с экстрагирующим буфером добавить 200 мкл образца.
3. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
4. Добавить 500 мкл **лизирующего раствора (реагент №2)** в каждую пробирку с исследуемыми образцами.
5. В пробирки для **ОКО-В** внести 500 мкл лизирующего раствора и 500 мкл деинизированной воды.
6. Перейти к пункту 4 этапа **Лизис**.

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 700 мкл супернатанта после центрифугирования образцов и перенести в подготовленные 1,5 мл пробирки, содержащие лизирующий раствор. В пробирки для **ОКО-В** добавить 500 мкл деинизированной воды.
***Примечание:** в случае, если объем супернатанта меньше, чем 700 мкл, объем образца может быть уменьшен до 300-500 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 микроцентрифуги-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»**: хранить в сухом защищенном от света месте при температуре +18-+25;

7.2 Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов **«ФитоСорб»** 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 с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 (либо специально предназначенное вспомогательное помещение) с целью последующей инактивации (МУ 1.3.2569-09).

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.3684-21.).

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»** 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.