

Паспорт технологии
Методика идентификации вирусов яблони методом ПЦР
(СТО 00668034-166-2023)

Показатель	Характеристика технологии																				
Назначение технологии	Технология предназначена для идентификации вирусов яблони домашней в лабораторных условиях с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и обратной транскрипции (ОТ), а также специфических молекулярных маркеров. Представленная технология является важным элементом в получении оздоровленного безвирусного посадочного материала яблони в рамках реализации деятельности селекционно-питомниководческого центра.																				
Описание технологии	Технология основана на использовании обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР, и детектирования продуктов ПЦР с использованием красителя SYBR® Green и амплификатора в реальном времени QuantStudio TM 5 System. Этапы идентификации целевых вирусных патогенов яблони: - экстракция проб ДНК; - постановка реакции обратной транскрипции (ОТ): Обратная транскрипция проводится в два этапа. На первом этапе производится денатурация вторичных структур праймеров и матрицы тотальной РНК. 1) Предварительная денатурация. В пластиковую пробирку объемом 1 мл из расчёта на необходимое количество образцов, внести следующие компоненты в указанных ниже пропорциях и порядке (из расчёта на 1 реакцию). <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>РНК (мкл)</td><td style="text-align: right;">3</td></tr> <tr> <td>Праймеры (соотношение Oligo(dT)15 / Random (dN)10 - 1:1) (мкл)</td><td style="text-align: right;">2</td></tr> <tr> <td>H₂O (мкл)</td><td style="text-align: right;">4</td></tr> <tr> <td>Сумма (мкл)</td><td style="text-align: right;">9</td></tr> </table> В зависимости от концентрации матрицы РНК и целей обратной транскрипции, возможна корректировка состава и пропорций реакционной смеси. Условия денатурации: 70 °С в течении 5 мин., затем поместить в морозильную камеру при – 20 °С на 3 мин. 2) Реакция обратной транскрипции. Реакционная смесь для ОТ (из расчёта на 1 реакцию): <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>5x буфер (мкл)</td><td style="text-align: right;">4</td></tr> <tr> <td>dNTP (мкл)</td><td style="text-align: right;">2</td></tr> <tr> <td>DTT (мкл)</td><td style="text-align: right;">2</td></tr> <tr> <td>MMLV rt-sa (мкл)</td><td style="text-align: right;">1</td></tr> <tr> <td>H₂O (мкл)</td><td style="text-align: right;">2</td></tr> <tr> <td>Сумма (мкл)</td><td style="text-align: right;">11</td></tr> </table> Реакция проводится термоциклере в следующем режиме: 43 °С в течении 40 мин, 94 °С в течении 3 мин. При работе с сложными матрицами или крупными РНК транскриптами возможно повышение температуры до 45 – 50 °С и увеличение времени инкубации до 50 – 60 мин. Полученный препарат кДНК используется для последующей постановки ПЦР.	РНК (мкл)	3	Праймеры (соотношение Oligo(dT)15 / Random (dN)10 - 1:1) (мкл)	2	H ₂ O (мкл)	4	Сумма (мкл)	9	5x буфер (мкл)	4	dNTP (мкл)	2	DTT (мкл)	2	MMLV rt-sa (мкл)	1	H ₂ O (мкл)	2	Сумма (мкл)	11
РНК (мкл)	3																				
Праймеры (соотношение Oligo(dT)15 / Random (dN)10 - 1:1) (мкл)	2																				
H ₂ O (мкл)	4																				
Сумма (мкл)	9																				
5x буфер (мкл)	4																				
dNTP (мкл)	2																				
DTT (мкл)	2																				
MMLV rt-sa (мкл)	1																				
H ₂ O (мкл)	2																				
Сумма (мкл)	11																				

	- проведение ПЦР в реальном времени: Подготовка реакционной смеси ПЦР: в пластиковую пробирку объемом 1 мл из расчёта на необходимое количество образцов, внести следующие компоненты в указанных ниже пропорциях и порядке (из расчёта на 1 реакцию): <table> <tr> <td>Буфер (мкл)</td><td>2,5</td></tr> <tr> <td>dNTP (мкл)</td><td>4</td></tr> <tr> <td>кДНК (мкл)</td><td>3</td></tr> <tr> <td>Taq (мкл)</td><td>0,2</td></tr> <tr> <td>Primer F (мкл)</td><td>2</td></tr> <tr> <td>Primer R (мкл)</td><td>2</td></tr> <tr> <td>SYBR® Green</td><td>0,5</td></tr> <tr> <td>H₂O (мкл)</td><td>10,8</td></tr> <tr> <td>Сумма (мкл)</td><td>25</td></tr> </table> Концентрация рабочего раствора праймеров может варьировать в зависимости от эффективности применяемой полимеразы. Рекомендуемая концентрация 4 пкм/мкл. Матрица кДНК вносится непосредственно в пробирку объемом 0,2 мкл. Аmplification проводится в термоциклере обеспечивающем детекцию ПЦР в реальном времени QuantStudio TM 5 System в следующих режимах: 95 °С в течении 15 мин, 95 °С в течении 15 сек, n °С в течении 30 сек, 72 °С в течении 60 сек – 40–45 циклов с финальной элонгацией при 72 °С в течении 10 мин. Для проведения амплификации используют праймерные пары специфичные к целевому фрагменту генома вируса. Для подтверждения качества амплификации необходимо использовать праймерные пары внутреннего контроля, в отдельной пробирке.	Буфер (мкл)	2,5	dNTP (мкл)	4	кДНК (мкл)	3	Taq (мкл)	0,2	Primer F (мкл)	2	Primer R (мкл)	2	SYBR® Green	0,5	H ₂ O (мкл)	10,8	Сумма (мкл)	25
Буфер (мкл)	2,5																		
dNTP (мкл)	4																		
кДНК (мкл)	3																		
Taq (мкл)	0,2																		
Primer F (мкл)	2																		
Primer R (мкл)	2																		
SYBR® Green	0,5																		
H ₂ O (мкл)	10,8																		
Сумма (мкл)	25																		
Основные показатели технологии	Технология характеризуется относительно низкой себестоимостью в реализации и сокращением времени анализа в целом на 1 час за счёт использования технологии одновременной детекции продуктов ПЦР в процессе амплификации. Метод визуализации данных, предлагаемый в технологии прост и дешёв в исполнении и обеспечивает однозначную интерпретацию данных. Применение данной технологии будет способствовать через увеличение выхода безвирусного посадочного материала в маточниках в среднем на 40 % повышению устойчивости яблоневого агроценоза к биотическим факторам среды, увеличению уровня реализации продукционного потенциала в среднем на 10 % и повышение урожайности семечковых культур (яблони) в среднем на 10 %. Технология обеспечивает снижение издержек на защитные мероприятия в среднем на 5-8 % и снижение издержек относительно доходной части на 3,5 пункта.																		
Сведения об использованных при разработке технологии научно-технических заделах (собственных)	1. Федорович С.В., Супрун И.И., Степанов И.В. Оптимизация метода ПЦР-диагностики вируса шарки сливы // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2022. № 78 (6). С. 275-286. 2. Насонов А.И., Супрун И.И., Федорович С.В. Способ выделения тотальной рибонуклеиновой кислоты из тканей растений																		

разработках) Получателя	плодовых культур Патент на изобретение RU 2803798 C1, 19.09.2023. Заявка № 2022130861 от 28.11.2022. 3. Насонов А.И., Юрченко Е.Г., Подгорная М.Е., Супрун И.И. Диагностика патогенов и вредителей в питомниках // В книге: Организация технологических процессов производства посадочного материала плодовых культур. Краснодар, 2019. С. 173-178.
Сведения об эффективности и конкурентоспособности технологии	Конкурентоспособность технологии достигается использованием точного и высокочувствительного способа оценки 2 наиболее встречаемых и значимых вирусов яблони домашней с использованием молекулярного маркирования методом ПЦР в реальном времени: ямчатости древесины яблони (Apple stem pitting virus – ASPV) и мозаики яблони (Apple mosaic virus – ArMV). Для этих вирусов предложены молекулярные маркеры, оптимизированы условия их применения и апробирована их эффективность в анализе симптомированного растительного материала. Технологический эффект предлагаемой технологии, являющийся и конкурентным ее преимуществом, заключается в сокращении времени анализа за счёт использования ПЦР в реальном времени (амплификатор QuantStudio TM 5 System), что важно при проведении массовых рутинных оценок посадочного материала на вирусоносительство.
Сведения о результатах интеллектуальной деятельности, в том числе селекционных достижениях, использованных в технологии	Насонов А.И., Супрун И.И., Федорович С.В. Способ выделения тотальной рибонуклеиновой кислоты из тканей растений плодовых культур. Патент на изобретение RU 2803798 C1, 19.09.2023. Заявка № 2022130861 от 28.11.2022. Способ выделения РНК из растительных тканей различных плодовых культур включает лизис клеточных мембран и экстракцию из клеток в оригинальном экстрагирующем буфере, осаждение рибонуклеиновой кислоты и промывку в солевом буферном растворе и селективное осаждение РНК в растворе LiCl/мочевина. Добавление в экстрагирующий буфер ПВП 40 позволило удалить примеси органических загрязнителей и защитить молекулы НК от окислительного повреждения, а включение в процесс выделения этапов осаждения изопропанолом и промывки в буферах, содержащих ацетат натрия, повышает выход тотальной РНК. Осаждение РНК в присутствии LiCl/мочевина в конечной концентрации 4 М, позволило избавиться от примеси ДНК в выделяемом образце.

Руководитель

Егоров Е.А.

