

ՀՀ Էկոնոմիկայի նախարարություն

Բանջարաբուստանային և տեխնիկական  
մշակաբույսերի գիտական կենտրոն



Ֆիտոպաթոգենների մոլեկուլային  
ախտորոշումը իրական ժամանակում  
պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի  
Իժ-ՊՇՌ (qPCR) մեթոդով

Գիտամեթոդական ձեռնարկ  
2025



Ի.Վ.Վարդանյան, Գ.Ժ.Սարգսյան,  
Ա.Ս Փահլևանյան, Հ.Հ. Մարտիրոսյան

Ֆիտոպաթոգենների մոլեկուլային ախտորոշումը  
իրական ժամանակում պոլիմերազային շղթայական  
ռեակցիայի Իժ-ՊՇՌ (qPCR) մեթոդով

Գիտամեթոդական ձեռնարկ

Երևան  
Հեղինակային հրատարակություն  
2025

ՀՏԴ 577.2:632(07)

ԳՄԴ 28.070.2+44.7g7

Ֆ 647

Աշխատանքը հավանության է արժանացել ՀՀ ԷՆ «Բանջարաբուստանային և տեխնիկական մշակաբույսերի գիտական կենտրոն» ՓԲԸ-ի Գիտական խորհրդի կողմից (21.11. 2025թ., արձանագրություն թիվ 11)

Գիտամեթոդական ձեռնարկը մշակվել է ֆիտոպաթոգենների ախտորոշման ժամանակակից մոլեկուլային մեթոդների՝ մասնավորապես իրական ժամանակում պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի (qPCR) մեթոդի սկզբունքները, առավելությունները և կիրառման առանձնահատկությունները ներկայացնելու նպատակով:

Խմբագիր՝ Ա.Է. Ավագյան, կ.գ.թ.

Ֆիտոպաթոգենների մոլեկուլային ախտորոշումը իրական

Ֆ 647 ժամանակում պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի ԻԺ-ՊՇՌ (qPCR) մեթոդով / Ի. Վ. Վարդանյան, Գ. Ժ. Սարգսյան, Ա. Մ. Փահլևանյան, Հ. Հ. Մարտիրոսյան.- Եր.: Հեղ. հրատ., 2025.- 59 էջ:

Գիտամեթոդական ձեռնարկը նախատեսված է գենետիկների, բույսերի պաշտպանների, կենսաբանների, բուսաբույծների, ինչպես նաև մագիստրոսների և ասպիրանտների համար: Հետազոտությունն իրականացվել է ՀՀ ԿԳՄՄ Բարձրագույն կրթության և գիտության կոմիտեի ֆինանսական աջակցությամբ՝ 25RG-4B069 ծածկագրով «Մոլեկուլային կենսաբանության մեթոդների և տեղեկատվական տեխնոլոգիաների կիրառումը Հայաստանում բանջարային մշակաբույսերի հիվանդությունների հսկողության և կառավարման նպատակով» թեմայի շրջանակներում:

ՀՏԴ 577.2:632(07)

ԳՄԴ 28.070.2+44.7g7

ISBN 978-9939-0-5632-6

© Վարդանյան Ի.Վ., 2025

© Սարգսյան Գ.Ժ., 2025

© Փահլևանյան Ա.Մ., 2025

© Մարտիրոսյան Հ.Հ., 2025

© ՀՀ ԷՆ «Բանջարաբուստանային և տեխնիկական մշակաբույսերի գիտական կենտրոն» ՓԲԸ, 2025

## Հապավումներ

**ՊՇՌ** - Պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի մեթոդ (PCR Polymerase Chain Reaction)

**ԻԺ-ՊՇՌ** - Իրական ժամանակում քանակական պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի մեթոդը (qPCR, quantitative Polymerase Chain Reaction)

**ՀՏ-ԻԺ-ՊՇՌ** – Հակադարձ տրանսկրիպտացիայի իրական ժամանակում պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի մեթոդը (RT-qPCR, Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction)

**ԻՖՍ**- Իմունոֆերմենտային անալիզ (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

**Ct** – Ցիկլի շեմ (Cycle threshold)

**ԴՆԹ** - Դեզօքսիռիբոնուկլեինաթթու

**ՌՆԹ** - Ռիբոնուկլեինաթթու

**ԴՆազ**– դեզօքսիռիբոնուկլեազա (DNase, Deoxyribonuclease)

**ՌՆազ** – ռիբոնուկլեազա (RNase, Ribonuclease)

**դՆՏՖ** - դեօքսիռիբոնուկլեոզիդտրիֆոսֆատներ (dNTP Deoxynucleoside Triphosphates)

**կԴՆԹ** - կոմպլեմենտարային ԴՆԹ (complementary DNA)

**CTAB** - Ցետիլտրիբրոմիդամոնիում բրոմիդ (Cetyltrimethylammonium bromide)

**PVP** – պոլիվինիլպիրրոլիդոն (Polyvinylpyrrolidone)

**β-ME** - β-մերկապտոէթանոլ (β-mercaptoethanol)

**ԴՄ**- Դրական ստուգիչ (PC, Positive Control)

**ԲՄ**- Բացասական ստուգիչ (NTC, No Template Control)

**մկլ**- միկրոլիտր

# ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

<b>Ներածություն</b>	6
<b>1. Իրական ժամանակում պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի Իժ-ՊՇՌ (qPCR) մեթոդի հիմունքները</b>	
1.1. Իժ-ՊՇՌ -ի համեմատությունը դասական ՊՇՌ-ի և ԻՖԱ-ի հետ	10
1.2. Իժ-ՊՇՌ -ի իրականացման համար անհրաժեշտ սարքավորումներ	12
1.3. Իժ-ՊՇՌ և ՀՏ-Իժ-ՊՇՌ-ի հիմնական փուլերը	15
1.4. Ֆյուորեսցենտ ներկեր և զոնդեր	22
1.5. Զգայունության շեմը և արդյունքների մեկնաբանումը	26
<b>Գործնական մաս</b>	
<b>2. Բուսական նմուշների ընտրություն</b>	29
<b>3. Պաթոգեն նուկլեինաթթուների մեկուսացում</b>	32
<b>4. Իժ-ՊՇՌ մեթոդի իրականացում</b>	
4.1. Ռեակցիոն խառնուրդի պատրաստում և ամպլիֆիկացման ռեժիմ	45
4.2. Ստանդարտ լուծույթների պատրաստում և արդյունքների վերլուծություն	47
4.3. Աղտոտվածություն և ասիայիկ ամպլիֆիկացիոն կորեր	55
<b>Գրականության ցանկ</b>	58

## ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Ժամանակակից գյուղատնտեսությունը բախվում է լուրջ մարտահրավերների, որոնք պայմանավորված են ֆիտոպաթոգենների տարածմամբ՝ առաջացնելով հիվանդություններ և զգալի բերքի կորուստներ: Այս իմաստով հատկապես խոցելի են բանջարային մշակաբույսերը՝ լոլիկը, տաքդեղը, վարունգը և այլն, որոնք առանցքային դեր ունեն ագրոպարենային համակարգում և ապահովում են բնակչությանը բարձրորակ սննդամթերքով:

Վերջին տարիներին գյուղատնտեսությանը մեծ վնաս են հասցնում վիրուսային, բակտերիալ և սնկային վարակիչ հիվանդությունները, որոնք տարածվում են սերմերի, հողի և միջատների միջոցով, ինչպես նաև մեխանիկական ձևով: Գյուղատնտեսական մշակաբույսերի հիվանդությունների տարածման խնդիրը դառնում է ավելի խոցելի և արդիական կլիմայի փոփոխությունների հետ կապված: Օդի ջերմաստիճանի բարձրացումը և խոնավության նվազումը նպաստում են բույսերի իմունիտետի թուլացմանը, պաթոգենների բազմացման ինտենսիվացմանը, նոր հիվանդությունների առաջացմանը, ինչպես նաև դրանց տարածմանը նոր տարածաշրջաններ:

Հիվանդությունների ախտորոշման ավանդական մեթոդները (տեսողական գնահատում, մանրէաբանական հետազոտություններ) աշխատատար և ժամանակատար են, հակված են վարակման մեծ հավանականությամբ՝ թույլ չտալով հայտնաբերել վարակը զարգացման վաղ փուլերում:

Հիվանդությունների ախտորոշման նպատակով օգտագործվող Իմունոֆերմենտատիվ անալիզի ԻՖՍ (ELISA) մեթոդը համեմատաբար ավելի ճշգրիտ է, սակայն զգայունության առումով զիջում է մոլեկուլային մեթոդներին: Մոլեկուլային պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի ՊՇՌ (PCR) մեթոդը արագացնում է պաթոգենների հայտնաբերումը, իսկ դրա քանակական որոշման Իրական ժամանակում պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի մեթոդը ԻԺ-ՊՇՌ (qPCR), ապահովում է բարձր զգայունություն, յուրահատուկ ազդեցություն և պաթոգենի քանակական որոշում:

ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդը թույլ է տալիս՝

- հայտնաբերել պաթոգենները հիվանդության վաղ փուլում նախքան ախտանիշների ի հայտ գալը,
- քանակապես գնահատել վարակման մակարդակը,
- վերահսկել ցանքատարածքների ֆիտոսանիտարական վիճակը,
- ժամանակին օպտիմալացնել բույսերի պաշտպանության միջոցառումները:

Բանջարաբուստանային և տեխնիկական մշակաբույսերի գիտական կենտրոնի Բույսերի կենսատեխնոլոգիայի, ֆիտոպաթոլոգիայի և կենսաքիմիայի լաբորատորիայում բանջարային մշակաբույսերի սնկային, բակտերիալ և վիրուսային հիվանդությունների ախտորոշումը իրականացվում է ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդով, ինչը թույլ է տալիս ստանալ հուսալի տվյալներ նույնիսկ թաքնված վարակների

դեպքում և արագորեն ձեռնարկել պաշտպանական միջոցառումներ:

Սույն գիտա-մեթոդական ձեռնարկում մանրամասն նկարագրված են բուսական նմուշների ընտրության, ԴՆԹ և ՌՆԹ մեկուսացման, ռեակցիոն խառնուրդի պատրաստման, ամպլիֆիկացիայի իրականացման արձանագրությունները (պրոտոկոլները), ինչպես նաև ստացված արդյունքների մեկնաբանությունները: Գործնական հրահանգները հնարավորություն են տալիս մոլեկուլային վերլուծության համար ստանալ մաքուր և որակյալ գենետիկական նյութ: Ստանդարտ նոսրացումների ճիշտ պատրաստումն ու տրամաչափական (կալիբրացիոն) կորի կառուցումը թույլ է տալիս քանակապես ճշգրիտ որոշել վարակվածության մակարդակը և վստահելիորեն մեկնաբանել արդյունքները:

Չնայած ձեռնարկում նկարագրված են Genetic Analysis Strategies S.L. (Իսպանիա) ընկերության կոմերցիոն հավաքածուների և LightCycler 96 (Roche, Գերմանիա) սարքի օգտագործմամբ առանձին արձանագրություններ, այնուհանդերձ, ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդի հիմնական սկզբունքները ունիվերսալ են և կիրառելի այլ հավաքածուների ու ամպլիֆիկատորների դեպքում:

Սույն մեթոդական ձեռնարկը նախատեսված է ֆիտոպաթոլոգիական լաբորատորիաների մասնագետների, կենսաբանների, գենետիկների, ագրոնոմների և բույսերի պաշտպանության ոլորտի մասնագետների, ինչպես նաև մագիստրոսների և ասպիրանտների համար: Այն հանդիսանում է ժամանակակից մոլեկուլային մեթոդներով

Ֆիտոպաթոգենների ախտորոշման համընդհանուր ուղեցույց  
և նպաստում է ֆիտոսանիտարական մոնիթորինգի որակի  
բարձրացմանն ու բույսերի պաշտպանության ոլորտում  
գիտական աշխատանքների արդյունավետության  
բարձրացմանը:

# 1. Իրական ժամանակում պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի Իժ-ՊՇՌ (qPCR) մեթոդի հիմունքները

## 1.1. Իժ-ՊՇՌ-ի համեմատությունը դասական ՊՇՌ-ի և ԻՏԱ- ի հետ

---

Իրական ժամանակում պոլիմերազային շղթայական  
ռեակցիայի (qPCR) մեթոդը տարբերվում է դասական ՊՇՌ  
(PCR) մեթոդից նրանով, որ թույլ է տալիս հետևել  
նուկլեինաթթուների ամպլիֆիկացիայի ընթացքին  
ռեակցիայի գործընթացում: Դասական ՊՇՌ-ի ժամանակ  
արդյունքը որոշվում է էլեկտրոֆորեզի շնորհիվ, ինչը տալիս է  
միայն որակական տեղեկություն նպատակային  
(թիրախային) հատվածի առկայության մասին: Ի  
տարբերություն դրան, Իժ-ՊՇՌ-ի ժամանակ գրանցվում է  
ֆլյուրեսցենտ ազդանշանը յուրաքանչյուր ցիկլի ընթացքում,  
որը ապահովում է՝

1. **Թիրախային պաթոգենի նախնական քանակի գնահատում:**  
Շեմային արժեքի՝ Ct-ի (Cycle threshold) միջոցով հնարավոր  
է որոշել թիրախային ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի խտությունը նմուշում:
2. **Բարձր զգայունություն և յուրահատկություն:**  
Օգտագործելով հատուկ ֆլյուրեսցենտ զոնդեր կամ ներկեր,  
նվազում է կեղծ դրական ազդանշանների ռիսկը:
3. **Վարակման ռիսկի նվազեցում:** Քանի որ ռեակցիան տեղի է  
ունենում փակ համակարգում, ապա անհրաժեշտություն  
չկա վերլուծության համար փորձանոթները բացել, ինչպես

դա անհրաժեշտ է դասական ՊՇՌ-ի դեպքում՝ գելի կիրառմամբ:

4. **Մուլտիպլեքսման հնարավորություն:** ԻԺ-ՊՇՌ-ն թույլ է տալիս միաժամանակ հայտնաբերել մի քանի տարբեր պաթոգեններ մեկ նմուշում՝ օգտագործելով տարբեր ֆլուորոֆորներ:
5. **Վերլուծության ժամանակի կրճատում:** Արդյունքը ֆիքսվում է իրական ժամանակում, բացակայում է լրացուցիչ փուլերի անհրաժեշտությունը, ինչը կրճատում է ընդհանուր հետազոտության ժամանակը:

Համեմատած Իմունոֆերմենտային անալիզի ԻՖԱ (ELISA) հետ՝ ԻԺ-ՊՇՌ-ն ունի հետևյալ առավելությունները՝

1. **Հայտնաբերման սկզբունք:** ԻԺ-ՊՇՌ-ն հայտնաբերում է նուկլեինաթթուները, իսկ ԻՖԱ-ն՝ սպիտակուցային մոլեկուլներ (անտիգեններ կամ հակամարմիններ):
2. **Զգայունություն:** ԻԺ-ՊՇՌ-ն թույլ է տալիս հիվանդության լատենտ փուլում հայտնաբերել շատ ցածր խտությամբ պաթոգենները, ի տարբերություն ԻՖԱ-ի, որի զգայունությունը ցածր է վարակման հենց վաղ փուլերում:
3. **Ունիվերսալություն:** ԻԺ-ՊՇՌ-ում հատուկ զոնդերի կիրառումը ապահովում է բարձր ճշգրտություն, մինչդեռ ԻՖԱ-ն կարող է տալ կեղծ դրական կամ խաչաձև արդյունք նման կամ հարակից հակազենների առկայության դեպքում:
4. **Վերլուծության արագություն:** ԻԺ-ՊՇՌ-ը հնարավորություն է տալիս արդյունքը ստանալ մի քանի

Ժամում, մինչդեռ ԻՖԱ-ն ինկուբացիոն և լվացման փուլերի համար սովորաբար պահանջում է երկար ժամանակ:

**5. Քանակական վերլուծություն:** ԻԺ-ՊՇՌ-ն ապահովում է քանակական տվյալներ պաթոգենի խտության մասին, մինչդեռ ԻՖԱ-ն հաճախ օգտագործվում է որպես որակական կամ կիսաքանակական որոշման մեթոդ:

Արդյունքում՝ ԻԺ-ՊՇՌ-ն առավել տեղեկատվական և հուսալի մեթոդ է համեմատած դասական ՊՇՌ-ի և ԻՖԱ-ի հետ, հատկապես բարդ համակարգերի դեպքում, ինչպիսիք են բուսական հյուսվածքները, որտեղ պաթոգենների խտությունը կարող է ցածր լինել, իսկ ռեակցիայի ինհիբիտորների առկայությունը՝ բարձր:

Սակայն, չնայած զգալի առավելություններին, ԻԺ-ՊՇՌ-ն ունի նաև որոշ սահմանափակումներ. սարքավորումների և ռեագենտների բարձր արժեք, առձանագրությունների և տրամաչափական կորերի խիստ ստանդարտավորման անհրաժեշտություն, ինչպես նաև պաթոգեն թիրախների միաժամանակ որոշվող սահմանափակ թիվ:

## **1.2. ԻԺ-ՊՇՌ-ի իրականացման համար անհրաժեշտ սարքավորումներ**




---


ԻԺ-ՊՇՌ-ի իրականացման համար անհրաժեշտ է միջազգային ստանդարտներին համապատասխանող մասնագիտացված լաբորատոր սարքավորումներ: Աղյուսակ

1-ում ներկայացված են այն սարքավորումները որոնք կիրառվում են ԻՇ-ՊՇՌ-ի տարբեր փուլերում:

**Աղյուսակ 1. ԻՇ-ՊՇՌ իրականացման համար անհրաժեշտ սարքավորումները**

Սարքավորում	Լուսանկար	Օգտագործման փուլ	Նշանակություն	Հիմնական տեխնիկական բնութագրում
Լամինար պահարան		Նմուշների նախապատրաստում, նուկլեինաթթուների առանձնացում	Ապահովում է ստերիլ միջավայր, կանխում է ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի և ռեզենտների ախտոտումը	Անվտանգության II դաս, HEPA ֆիլտր
ՊՇՌ-բոքս (UV-բոքս)		Ռեակցիոն խառնուրդների պատրաստում	Կանխում է խաչաձև ախտոտումը ռեակցիոն խառնուրդի պատրաստման ժամանակ	UV լամպ՝ 254 նմ, աշխատանքային խցիկ՝ 60–80 սմ
Միկրոպիպետներ իրենց ծայրակալներով		Բոլոր փուլերում	Ռեզենտների և նմուշների ծավալների ճշգրիտ չափում	Պիպետների ծավալի միջակայք՝ 0,5–1000 մկլ, ֆիլտրով ծայրակալներ

<p>Միկրոցենտրիֆուգա</p>		<p>Նուկլեինաթթւոնների առանձնացում</p>	<p>Ապահովում է բաղադրիչների խառնուրդը և նստեցումը փորձանոթի հատակին</p>	<p>Արագություն՝ 1000–16000 պտ/րոպե, ռոտորի ծավալ՝ 1,5–2 մլ</p>
<p>Թերմոբլոկ</p>		<p>Նմուշների նախնական ինկուբացիա՝ նուկլեինաթթւոնների առանձնացման ընթացքում</p>	<p>Ապահովում է օպտիմալ պայմաններ ռեակցիաների համար (լիզիս, ֆերմենտների ինակտիվացում և այլն)</p>	<p>Նախատեսված է 1,5–2 մլ փորձանոթների համար, ապահովում է 4–100°C, ժամանակաչափ՝ մինչև 99 րոպ.</p>
<p>Վորտեքս</p>		<p>Նմուշների էքստրակցիա և խառնում</p>	<p>Բաղադրիչների և նմուշների խառնում</p>	<p>Արագություն՝ 2500–3000 պտ/րոպե, 0,2–2 մլ փորձանոթների համար</p>

<p>ԻԺ-ՊՇՌ ամպլիֆիկատոր, ծրագրային ապահովմամբ</p>		<p>Ամպլիֆիկացիա և դետեկցիա</p>	<p>Իրականացնում է նուկլեինաթթուների ամպլիֆիկացիա՝ ֆլյուորեսցենտային ազդանշանի զուգահեռ գրանցմամբ</p>	<p>Ջերմաստիճանի միջակայք՝ 4–99°C, տաքացման/սառեցման արագություն՝ 3–5°C/վրկ, դետեկտորներ՝ FAM/HEX/ROX</p>
--	---	--------------------------------	--	--

### 1.3. ԻԺ-ՊՇՌ և ՀՏ- ԻԺ-ՊՇՌ-ի հիմնական փուլերը

ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդը թույլ է տալիս ոչ միայն հայտնաբերել նպատակային ԴՆԹ-ի հաջորդականությունների առկայությունը, այլև քանակապես գնահատել դրանց պարունակությունը բուսական նմուշներում: Մեթոդի էությունն է կրկնվող ջերմային ցիկլերի ընթացքում որոշակի ԴՆԹ հատվածների բազմակի ամպլիֆիկացումը:

Ամպլիֆիկացիայի յուրաքանչյուր ցիկլը ընդգրկում է երեք հիմնական փուլեր (նկ. 1).

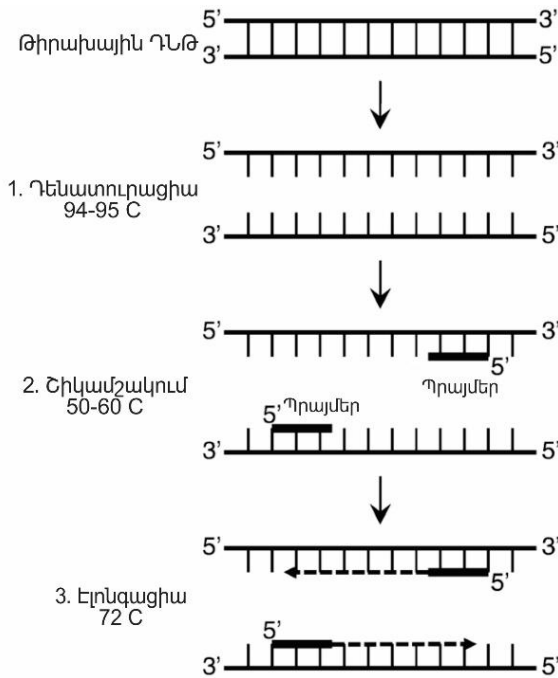
1. **Դենատուրացիա (բնափոխում) (Denaturation):** Բարձր ջերմաստիճանի (92-95°C) ազդեցության տակ հիմքերի միջև եղած ջրածնի կապերի խզման շնորհիվ ԴՆԹ-ի մոլեկուլը անցում է երկշղթայական ձևից միաշղթայականի:

2. **Շիկամշակում (Annealing)** (պրայմերների միացում միաշղթայական թիրախային ԴՆԹ): Այս փուլում ջերմաստիճանը իջեցվում է մինչև 50-60°C (կախված պրայմերների հաջորդականությունից և հալման ջերմաստիճանից), որի պայմաններում պրայմերները կոմպլեմենտարորեն միանում են թիրախային ԴՆԹ-ի համապատասխան հատվածներին՝ համաձայն Չարգաֆֆի կոմպլեմենտարության (Ա-Տ, Գ-Ց) կանոնի:

3. **Էլոնգացիա (սինթեզ) (Extension):** Պրայմերների միացումից հետո բարձրացվում է ջերմաստիճանը մինչև 72°C, որը հանդիսանում է ջերմակայուն Taq-պոլիմերազա ֆերմենտի համար օպտիմալ: Այս փուլում պրայմերի 3' ծայրից Taq-պոլիմերազայի շնորհիվ սկսվում է երկրորդ ԴՆԹ շղթայի կառուցումը/ սինթեզը՝ օգտագործելով դեզօքսինուկլեոտիդորիֆոսֆատների (դՆՏՖ/ dNTP) խառնուրդը: Ամպլիկացիայի յուրաքանչյուր ցիկլ ամրագրվում է (ֆիքսվում) ֆլյուորեսցենտ ազդանշանով, որը առաջանում է կամ ֆլյուորեսցենտ SYBR Green ներկի ԴՆԹ-ի երկշղթայական մոլեկուլին ամրացման ժամանակ, կամ հատուկ հիֆրիդիզացիոն TaqMan գոնդերի ճեղքման ընթացքում:

Արդյունքում ստացված ազդանշանը կուտակվում է համաչափ ամպլիկոնների քանակի ձևով, և գրանցվում ԻԺ-ՊՇՌ սարքի դետեկտորով: Ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոփոխության հիման վրա կառուցվում է ամպլիֆիկացիայի կոր, որի միջոցով որոշվում է Ct շեմային արժեքը:

Ամպլիֆիկացիայի արդյունավետությունը ճշգրիտ քանակական վերլուծության համար ունի մեծ նշանակություն, քանի որ ռեակցիայի պայմանների օպտիմալացումը (պրայմերների և բուֆերների խտություն, շիկամշակման ջերմաստիճան, համապատասխան ֆլյուորեսցենտ ներկի կամ զոնդի ընտրություն) ունի առանցքային նշանակություն:



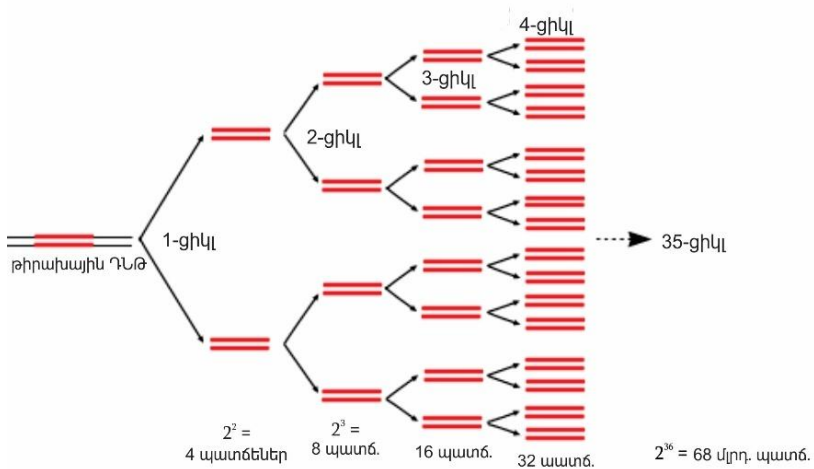
**Նկ. 1. Իժ-ՊՇՌ-ի հիմնական փուլերը**

Ցիկլի գործընթացի արդյունքում տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի թիրախային հատվածի քանակի էքսպոնենցիալ ավելացում: Այս գործընթացը նկարագրվում է հետևյալ բանաձևով:

$$A = M \cdot (1 + E)^n$$

որտեղ՝ A-ն ամպլիֆիկացիայի հետևանքով արտադրանքի ԴՆԹ-ի քանակն է, M-ն ԴՆԹ-ի սկզբնական պատճենների թիվը, E-ն ամպլիֆիկացման ռեակցիայի արդյունավետությունը, n-ն ամպլիֆիկացիայի ցիկլերի քանակը:

Պրայմերներով սահմանափակված ԴՆԹ-ի թիրախային հատվածները առաջին անգամ գրանցվում են երկրորդ ցիկլի ավարտին և հետագայում երկրաչափական պրոգրեսիայով կուտակվում՝ դառնալով ամպլիֆիկացիայի արտադրանքների գերակշռող մասը (նկ. 2):



**Նկ. 2. ԴՆԹ-ի թիրախային հատվածի էքսպոնենցիալ աճի գծապատկեր, կախված ցիկլերի քանակից**

ԻԺ-ՊՇՌ ցիկլերի դետեկցիան բերում է ամպլիֆիկացիման կորի կառուցմանը, որը ներառում է երեք հիմնական փուլեր՝ ինիցիացիայի, էքսպոնենցիալ աճի և պլատոյի (նկ. 3):

1. **Ինիցիացիայի (նախաձեռման) փուլ (Initiation phase):**

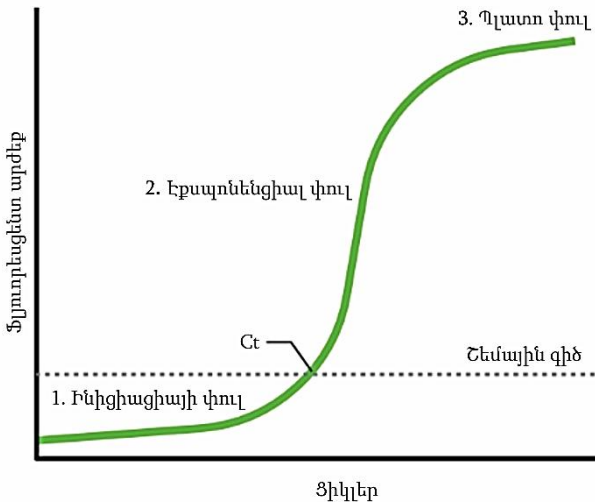
Առաջին ցիկլերի ընթացքում ամպլիֆիկացիայի արդյունքների քանակը չափազանց քիչ է լինում և չի գրանցվում դետեկտորի կողմից, հետևաբար արձանագրվող ազդանշանը համապատասխանում է հիմնական/ շեմային գծին:

2. **Էքսպոնենցիալ փուլ (Exponential phase):**

Ամպլիֆիկացիայի ժամանակ ԴՆԹ-ի քանակը աճում է էքսպոնենցիալ ձևով (յուրաքանչյուր ցիկլում՝ կրկնապատկվելով) և արդյունքում կորն անցնում է շեմային արժեքը (threshold), ինչի միջոցով որոշվում է C<sub>t</sub>-ի արժեքը: C<sub>t</sub>-ն անմիջականորեն կապ ունի սկզբնական ԴՆԹ-ի քանակի հետ. որքան ցածր է C<sub>t</sub>-ն, այնքան բարձր է թիրախային ԴՆԹ-ի խտությունը: C<sub>t</sub>-ի շեմը սահմանվում է հենց էքսպոնենցիալ փուլում, այդ պատճառով պլատո փուլում այն չի ազդում ռեակցիայի արդյունավետության նվազման վրա:

3. **Պլատո փուլ (Plateau phase):**

Ամպլիֆիկացիայի ուշ ցիկլերում արտադրանքի քանակի աճը դանդաղում է և աստիճանաբար դադարում: Այս երևույթը կոչվում է «պլատո էֆեկտ», որը պայմանավորված է դՆԹ-Ֆ և պրայմերների սպառմամբ, պոլիմերազայի ակտիվության նվազմամբ, ինհիբիտորների կուտակմամբ (օրինակ՝ պիրոֆոսֆատներ, ԴՆԹ-դուպլեքսներ) և այլն:



**Նկ. 3. Ամպլիֆիկացման կորի փուլերը**

Բույսերի հիվանդությունների ախտորոշման նպատակով ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդը կիրառվում է ԴՆԹ պարունակող պարոզեն սնկերի, մանրէների, ինչպես նաև որոշ վիրուսների հայտնաբերման դեպքում: ՌՆԹ պարունակող վիրուսների հայտնաբերման համար ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդը իրականացվում է հետադարձ տրանսկրիպցիայով ՀՏ-ԻԺ-ՊՇՌ (RT-qPCR, Reverse Transcription qPCR):

ՀՏ-ԻԺ-ՊՇՌ -ի հիմնական փուլերն են՝

1. **Հակադարձ տրանսկրիպցիա (Reverse transcription):** Հակադարձ տրանսկրիպտազա ֆերմենտի շնորհիվ, թիրախային հաջորդականություններին հատուկ պրայմերների օգտագործմամբ, թիրախային ՌՆԹ շղթայի

հիման վրա սինթեզվում է միաշղթա կոմպլեմենտար ԴՆԹ (կԴՆԹ):

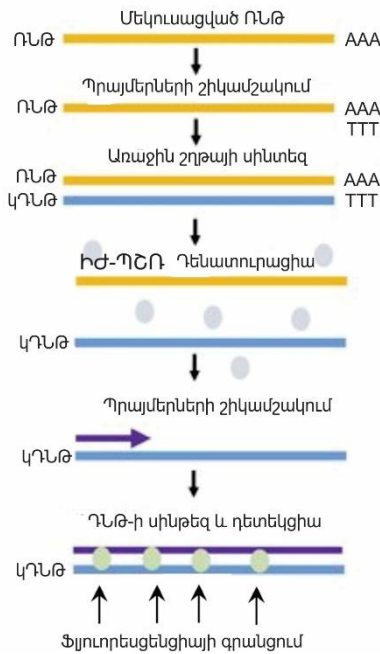
Իրական ժամանակում իրականացվող ՀՏ-ԻԺ-ՊՇՌ-ի համար նպատակահարմար է ընտրել բարձր ջերմաստիճանադիմացկուն հակադարձ տրանսկրիպտազա ֆերմենտը: Այն հնարավորություն է տալիս կԴՆԹ-ի սինթեզը իրականացնել ավելի բարձր ջերմաստիճաններում՝ ապահովելով բարձր երկրորդային կառուցվածք ունեցող ՌՆԹ-ի հաջող տրանսկրիպցիա, որը ռեակցիայի ընթացքում ապահովում է ֆերմենտի ամբողջական ակտիվությունը և կԴՆԹ-ի ավելի բարձր արդյունք:

2. **ԻԺ-ՊՇՌ:** Ստացված կԴՆԹ-ն ծառայում է որպես ելանյութ ստանդարտ ամպլիֆիկացման ցիկլերի համար, որը նույն սկզբունքով ներառում է դենատուրացիան, շիկամշակումը և էլոնգացիան:

3. **Ֆլյուորեսցենտային գրանցում (Fluorescent detection):** Ամպլիկոնների կուտակումը ֆիքսվում է իրական ժամանակում, ինչը թույլ է տալիս քանակապես գնահատել վիրուսային ՌՆԹ-ի մակարդակը (նկ. 4):

Ներկայումս ֆիտոպաթոգենների ախտորոշման համար լայնորեն կիրառվում են ՀՏ-ԻԺ-ՊՇՌ-ի կոմերցիոն հավաքածուները, որոնք հնարավորություն են տալիս օգտագործելով ընդհանուր բուֆերային միջավայր մեկ փորձանոթի մեջ, իրականացնելով մեկ փուլային ռեակցիա: Այս ձևաչափը նվազեցնում է վարակման (կոնտամինացիայի) ռիսկը, բարձրացնում է արդյունքների

վերարտադրելիությունը և արագացնում վերլուծության գործընթացը:



Նկ. 4. 2S-Իժ-ՊՇՌ իրականացման գծապատկերը

#### 1.4. Ֆյուորեսցենտ ներկեր և զոնդեր

Իժ-ՊՇՌ-ում ամպլիֆիկացիայի գրանցման համար կիրառվում են երկու հիմնական մոտեցում՝

1. **SYBR Green:** Ֆյուորեսցենտ ներկ է, որը կապվում է ցանկացած երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ:

- ✓ Առավելություններ. ցածր արժեք, կիրառման պարզություն:
- ✓ Թերություններ. կարող է կապվել ոչ-սպեցիֆիկ ամպլիֆիկացիոն արտադրանքի հետ, անհրաժեշտ է ամպլիկոնի սպեցիֆիկության վերահսկում: SYBR Green ներկի օգտագործումը հիմնականում կիրառվում է մեկ պաթոգենի հայտնաբերման համար, երբ անհրաժեշտ է որոշել մեկ նպատակային գենի կամ միկրոօրգանիզմի առկայությունը կամ քանակը: Չնայած յուրահատուկ և բազմաթիրախ վերլուծության սահմանափակումներին այս մեթոդը շարունակում է լայնորեն կիրառվել իր պարզության, ունիվերսալության և շահավետության շնորհիվ՝ մասնավորապես, այն լաբորատորիաներում, որտեղ պահանջվում է նմուշների զանգվածային ախտորոշումներ:

**2. TaqMan-զոնդեր:** Սպեցիֆիկ օլիգոնուկլեոտիդային զոնդեր են, որոնք պարունակում են ֆլյուորոֆորներ և մարող/կվաչեր-դեպրեսորներ (quencher): Ֆլյուորեսցենտ ազդանշանը առաջանում է միայն այն դեպքում, երբ զոնդը կապվում է ԴՆԹ-ի թիրախային հաջորդականության հետ և քայքայվում ամպլիֆիկացիայի ընթացքում:

- ✓ Առավելություններ. բարձր յուրահատկություն, տարբեր ֆլյուորոֆորների (FAM, HEX, Cy5) կիրառմամբ բազմաթիրախ (մուլտիպլեքս) վերլուծության հնարավորություն, ազդանշանի վրա ոչ-սպեցիֆիկ արտադրանքի ազդեցության նվազեցում:

✓ Թերություններ. բարձր արժեք, յուրաքանչյուր նպատակային գենի համար նախագծման,

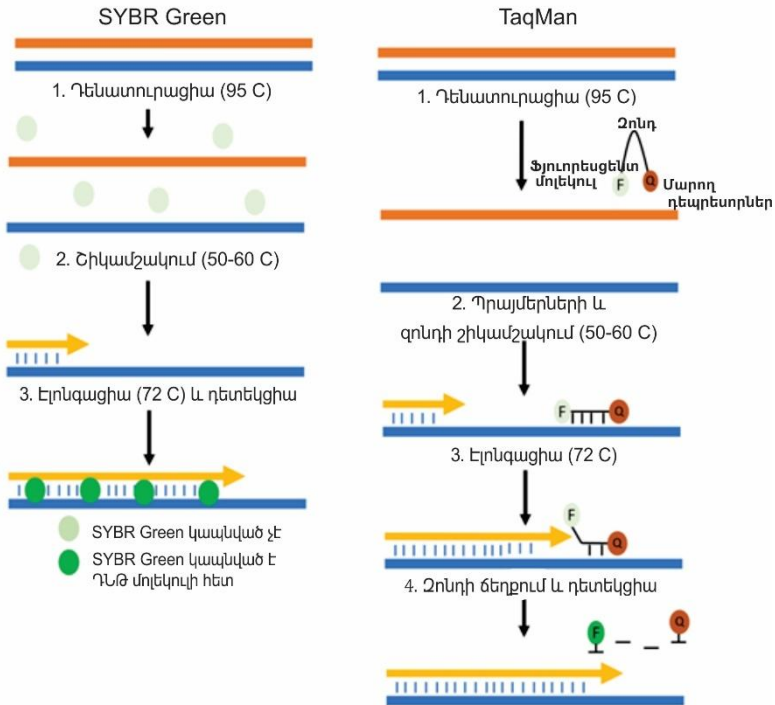
հատուկ գոնդերի ձեռք բերման անհրաժեշտություն:

Ներկայումս լայնորեն կիրառվում է մուլտիպլեքսային TaqMan ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդը, որը հնարավորություն է տալիս միննույն ռեակցիայի մեջ միաժամանակ հայտնաբերել մի քանի պաթոգեններ: Դրա համար օգտագործվում են տարբեր ֆլյուորոֆորներով նշված գոնդեր, որոնցից յուրաքանչյուրն արձակում է տարբեր ալիքի երկարությամբ լույս: Սա թույլ է տալիս սարքին տարբերել և գրանցել առանձին ազդանշանները:

Մուլտիպլեքսային TaqMan ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդը հատկապես հարմար է բուսական վիրուսների ախտորոշման համար, քանի որ դրանց գենոմները համեմատաբար փոքր են և սպեցիֆիկ գոնդերի նախագծման համար պարունակում են հստակ սահմանված հատվածներ: Սա ապահովում է ռեակցիայի բարձր սպեցիֆիկություն և հնարավորություն է տալիս նույն փորձանոթի մեջ միաժամանակ հայտնաբերել մի քանի վիրուս, օրինակ՝ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) և *Potato virus Y* (PVY)՝ առանց խաչաձև ազդանշանների:

Սնկերի և բակտերիաների գենոմների մեծության և բարդ կառուցվածքի, ինչպես նաև ոչ-սպեցիֆիկ կապերի բարձր հավանականության ու յուրաքանչյուր գոնդի անհատական օպտիմալացման անհրաժեշտության պատճառով մուլտիպլեքսային անալիզները գրեթե չեն կիրառվում:

Նկար 5-ում ներկայացված է Իժ-ՊՇՌ-ի երկու մոտեցումների ազդեցության գծապատկերները:



Նկ. 5. SYBR Green և TaqMan ազդեցության գծապատկեր

Ամպլիֆիկացիայի գրանցման մեթոդի ընտրությունը կախված է հետազոտության նպատակներից: SYBR Green մեթոդը հարմար է լայնածավալ անալիզների և մեկ պաթոգենի քանակական վերլուծությունների համար, երբ կարևոր են պարզությունը և ցածր արժեքը: TaqMan գոնդերը առավել նպատակահարմար են բարձր սպեցիֆիկությամբ և մուլտիպլեքսային ռեակցիաների համար, որոնք

հնարավորություն են տալիս միաժամանակ հայտնաբերել մի քանի պաթոգեն:

Գիտական կենտրոնի լաբորատորիայում օգտագործվում են իսպանական Genetic Analysis Strategies S.L. ընկերության կոմերցիոն հավաքածուներ, որոնք հիմնված են SYBR Green մեթոդի վրա և կիրառվում են մոնոդոզային ռեժիմով ֆիտոպաթոգենների (*Clavibacter michiganensis*, *Fusarium spp.* և այլն) հայտնաբերման համար: Այս մոտեցումը ապահովում է բարձր զգայնություն, լավ վերարտադրելիություն և օգտագործման պարզություն, ինչը այն հարմար է դարձնում մոլեկուլային ախտորոշման լայն կիրառությունների համար:

### 1.5. Զգայունության շեմը և արդյունքների մեկնաբանումը

ԻԺ-ՊՇՌ-ի իրականացման ընթացքում կարևոր ցուցանիշ է Ct ցիկլի շեմային արժեքը, որն իրենից ներկայացնում է ամպլիֆիկացիայի ցիկլերի այն թիվը, որի դեպքում ֆլյուորեսցենտային ազդանշանը առաջին անգամ գերազանցում է ֆոնի մակարդակը: Այս ցուցանիշը արտացոլում է այն պահը, երբ ամպլիֆիկացված արտադրանքի քանակը իրական ժամանակում գրանցման համար դառնում է բավարար:

Ճիշտ վերլուծության իրականացման համար անհրաժեշտ է, որ շեմը բոլոր նմուշների համար սահմանվի նույն կերպ: Ct-ի արժեքների մեկնաբանությունը կախված է թիրախային նուկլեինաթթվի սկզբնական կոնցենտրացիայից և ներկայացված է աղյուսակ 2-ում:

**Աղյուսակ 2. Ct-ի արժեքները և դրանց մեկնաբանությունները**

<b>Ցուցանիշ</b>	<b>Նկարագրու- թյուն</b>	<b>Ցիկլերի քանակ</b>	<b>Արդյունքների մեկնաբանու- թյուն</b>
<b>Ցածր Ct –ի արժեք</b>	Թիրախային ԴՆԹ/ ՌՆԹ-ի բարձր սկզբնական քանակ	<15	Թիրախի շատ բարձր կոնցենտրացիա
<b>Միջին Ct-ի արժեք</b>	Թիրախային ԴՆԹ /ՌՆԹ-ի միջին կոնցենտրացիա	15–30	Բավարար է հուսալի հայտնաբերման համար
<b>Բարձր Ct-ի արժեք</b>	Թիրախային ԴՆԹ-ի/ՌՆԹ-ի ցածր սկզբնական քանակ	30–35	Բավարար է հուսալի հայտնաբերման համար
<b>Բարձր Ct-ի արժեք (սահմանա- յին դրական արդյունք)</b>	Թիրախային ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի շատ ցածր կոնցենտրացիա (հնարավոր են սահմանային ազդանշաններ	35–38	Թիրախի հնարավոր առկայություն, ցանկալի է կրկնակի փորձարկում: Արդյունքը լիովին հուսալի չէ:

Ազդանշանի բացակայու- թյուն	Պաթոգենը չի հայտնաբերվել	–	Թիրախը բացակայում է կամ գտնվում է հայտնաբերման շեմից ցածր մակարդակի վրա
----------------------------------	-----------------------------	---	---

Բարձր Ct-ի արժեքները (>35) կարող են վկայել ոչ միայն թիրախային մոլեկուլի չափազանց ցածր պարունակության, այլև ռեակցիայի ինհիբիտորների առկայության կամ թույլ կոնտամինացիայի մասին: Նման արդյունքները հանդիսանում են որպես սահմանային դրական և դիտարկվում են որպես թիրախային հաջորդականության հնարավոր առկայություն, պահանջելով լրացուցիչ ստուգում կամ այլ պրայմերների/ զոնդերի կիրառմամբ վերահաստատում:

Թիրախային նուկլեինաթթվի սկզբնական պարունակության քանակական որոշման համար օգտագործվում է կալիբրացիոն կոր, որը կազմվում է հայտնի քանակությամբ ստանդարտ նմուշների հաջորդական նոսրացումների հիման վրա: Թիրախի կոնցենտրացիան հաշվարկելու նպատակով փորձարկվող նմուշների Ct արժեքները համեմատվում են այդ կորի հետ:

ԻԺ-ՊՇՌ-ի միջոցով քանակական որոշման հարցերը ավելի մանրամասն ներկայացված են ձեռնարկի 4-րդ բաժնում (էջ 45):

## Գործնական մաս

### 2. Բուսական նմուշների ընտրություն

Բուսական նմուշների ճիշտ ընտրությունը կարևոր փուլ է ֆիտոպաթոզեն օրգանիզմների հավաստի նույնականացման համար: Վերլուծության համար նյութը անհրաժեշտ է վերցնել բույսի այն օրգաններից, որտեղ հարուցիչի քանակը առավելագույնն է: Այս դեպքում կարևոր է հաշվի առնել ինչպես պաթոզենի կենսաշրջանի առանձնահատկությունները, այնպես էլ հիվանդության զարգացման փուլերը (աղ. 3):

Ախտորոշման համար կարևորվում է վարակված նմուշի ճիշտ պահպանումը: Սապրոտրոֆ մանրէների աճը կանխելու և նուկլեինաթթուների դեգրադացիայից խուսափելու համար խորհուրդ է տրվում ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի մեկուսացումը վարակված հյուսվածքներից կատարել հնարավորինս արագ՝ նմուշառումից հետո մի քանի ժամվա ընթացքում:

Անհրաժեշտության դեպքում բուսական վարակված նմուշները կարող են պահպանվել՝

- ✓ ԴՆԹ-ի մեկուսացման համար՝  $-20^{\circ}\text{C}$ -ում կարճաժամկետ կամ  $-80^{\circ}\text{C}$ -ում երկարաժամկետ սառեցում, կամ 70% էթանոլի լուծույթում:
- ✓ ՌՆԹ-ի մեկուսացման համար նախընտրելի է օգտագործել հատուկ ստաբիլիզատորներ (օրինակ՝ RNeasy) կամ սառեցում  $-80^{\circ}\text{C}$ -ում:

Նմուշների հետ աշխատելիս պետք է խուսափել բազմակի հալեցում/սառեցումից և օգտագործել ստերիլ գործիքներ:

**Աղյուսակ 3. Ախտահարված բանջարային մշակաբույսերի նմուշառման համար հյուսվածքները**

Պաթոգենի տեսակը	Հիվանդություն (պաթոգեն)	Նմուշառման համար հյուսվածքները	Նմուշառման սահմանները
Մնկային	Ֆիտոֆտորոզ ( <i>Phytophthora infestans</i> )	Շագանակագույն մոզախկայրվ տերևներ, տերևակոթոններ, կանաչ պտուղներ բնորոշ բծերով	Նեկրոտիկ և առողջ հատվածների սահման
	Վերտիցիլյոզային թառամում ( <i>Verticillium dahliae</i> )	Ցողունի արմատամերձ հատված, անոթային հյուսվածք	Ցողունի հորիզոնական կտրվածքներից, անոթների վնասված սահմանից
	Ֆուզարիոզային թառամում ( <i>Fusarium spp.</i> )	Վարակված արմատներ, ցողունի արմատամերձ հատված	Նեկրոզի եզրին
Բակտերիալ	Լոլիկի բակտերիալ քաղցքեղ ( <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> )	Թառամած ցողուններ, անոթային հյուսվածք, խոցերով պտուղներ	Անոթային հյուսվածք արմատամերձ հատվածից

	Բակտերիոզներ ( <i>Xanthomonas</i> spp, <i>Pseudomonas</i> spp)	Տերևներ և տերևակոթոններ նեկրոտիկ կամ խլորոտիկ բծերով, ախտահարված անոթային հյուսվածք	Ախտահարված և առողջ հյուսվածքների անցման գոտուց
	Բակտերիալ այրվածք ( <i>Erwinia amylovora</i> )	Երիտասարդ տերևներ, ծաղիկներ, կնճռոտ պտուղներ	Ընտրել ակտիվ աճող հյուսվածքներ, խուսափել խիստ փտած մասերից
Վիրուսային	Լուլիկի պտուղների շականակագույն կնճռոտություն (ToBRFV)	Երիտասարդ տերևներ, ծաղիկներ, կնճռոտ պտուղներ	Երիտասարդ հյուսվածքներ
	Պեպիևո վիրուսային մոզաիկա (PepMV), Լուլիկի բրունգայնություն (TSWV)	Ընձյուղների վերին մասեր, երիտասարդ տերևներ, վարակված պտուղներ	Երիտասարդ հյուսվածքներ

	Ծխախոտի վիրուսային մոզաիկա (TMV), Լոլիկի տերևների դեղին գանգոռոտություն (TYLCV)	Վերին տերևներ, մերիստեմներ, երիտասարդ ընձյուղներ	Երիտասարդ հյուսվածքներ
--	--	--	------------------------

### 3. Պաթոգեն նուկլեինաթթուների մեկուսացում

Ներկայումս մշակվել է ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի մեկուսացման մեթոդների և կոմերցիոն հավաքածուների լայն շրջանակ, որոնք օպտիմիզացված են նաև բուսական հյուսվածքների համար, որի հիմնական նպատակն է անկախ ընտրված արձանագրությունից (պրոտոկոլից) արդյունավետ կերպով ազատել նուկլեինաթթու բուսական բջիջներից և հեռացնել կամ անջատել ուղեկցող ադոնոպոզիտները, որոնք կարող են արգելակել ԻԺ-ՊՇՌ և ՀՏ-ԻԺ-ՊՇՌ ռեակցիաները:

Առաջնային հիմնական փուլերից մեկն է բուսական հյուսվածքների բջջային կառուցվածքների քայքայումը: Բակտերիաների նուկլեինաթթուների մեկուսացման դեպքում հաճախ բավական է հիմնային լիզիսը կամ ջերմային մշակումը, որն ապահովում է բջջային պատերի դեգրադացիա: Հարկ է նշել, որ հիվանդածին սնկերից, որոնց հիֆերը և սպորները ունեն ամուր բջջային թաղանթ, ԴՆԹ-ի մեկուսացումը վարակված բուսական հյուսվածքներից կարող

է բավարար չլինել: Այդ դեպքում նմուշները նախապես մանրացվում են հեղուկ ազոտի օգնությամբ:

Ֆիտոպաթոգենների վերլուծության ժամանակ նուկլեինաթթուների մեկուսացումը կատարվում է միաժամանակ բուսական հյուսվածքի նուկլեինաթթուների հետ, քանի որ պաթոգենները տեղակայված են ինչպես բջիջներում, այնպես էլ միջբջջային տարածքում: Անհրաժեշտ է ապահովել բուսական և պաթոգեն բջիջների միաժամանակ քայքայում, որը կնպաստի ստանալ թիրախային ԴՆԹ կամ ՌՆԹ նմուշ՝ հետագա մոլեկուլային վերլուծության համար:

Նուկլեինաթթուների մեկուսացման և մաքրման ժամանակակից մոտեցումները պայմանականորեն բաժանվում են երկու հիմնական խմբի՝

- **Աղտոտվածության աստիճանական հեռացման մեթոդներ ջրային լուծույթից:** Շատ տարածված է օրգանական լուծիչներով էքստրակցիոն տարբերակը (օրինակ՝ քլորոֆորմով): Այս մեթոդը կիրառելի է սնկերի և բույսերի վարակված հյուսվածքների մեծամասնության համար, սակայն սահմանափակվում է բարձր ՊՇՌ արգելակիչների կոնցենտրացիայի դեպքում:
- **Նուկլեինաթթուների մեկուսացումը հիմնված կոշտ ֆազայի սորբցիայի մեթոդով:** Այս դեպքում օգտագործվում են միանգամյա միկրոսյունային անոթներ (MiniSpin Column), որոնք պարունակում են սորբենտային մեմբրան (հիմնականում երկօքսիդ սիլիցիում կամ պոլիվինիլպոլիպիրոլիդոն՝ ՊՎՊ/ PVP): Անոթների վացումը բարձր իոնային խտությամբ լուծույթներով թույլ

Է տալիս հեռացնել սպիտակուցները և ցածրամոլեկուլային միացությունները՝ մեմբրանի վրա թողնելով միայն ԴՆԹ կամ ՌՆԹ-ն: Հետագայում էլյուցիայի գործընթացի ժամանակ օգտագործվում են ցածր իոնային խտությամբ լուծույթներ (օրինակ՝ թորած ջուր), որոնք ապահովում են մաքուր ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի ելը:

Գիտական կենտրոնի լաբորատորիայում կիրառվում է հենց այս մեթոդը, քանի որ այն ապահովում է ստանալ վարակված բուսական հյուսվածքներից բարձր մաքրությամբ ԴՆԹ/ ՌՆԹ, մասնավորապես այն նմուշներում, որոնք պարունակում են ՊՇՌ արգելակիչներ, ինչպիսիք են պոլիսախարիդներն ու պոլիֆենոլները:

Այսպիսով, նուկլեինաթթուների մեկուսացման և մաքրման մեթոդի ընտրությունը որոշվում է ինչպես հետազոտվող նյութի բնույթով, այնպես էլ ԻԺ-ՊՇՌ/ ՀՏ-ԻԺ-ՊՇՌ-ի համար նմուշի որակի և մաքրության պահանջներով:

ԴՆԹ և ՌՆԹ-ի մեկուսացման գործընթացում անհրաժեշտ է իմանալ պաթոգենի գենետիկական բնույթը հաշվի առնելով նուկլեինաթթուների պրոտոկոլների տարբերությունը: Աղյուսակ 4-ում ներկայացված է ըստ նուկլեինաթթվի տեսակի բանջարային մշակաբույսերի որոշ վնասակար պաթոգենների դասակարգումը:

Ստորև ներկայացված են ԴՆԹ և ՌՆԹ մեկուսացման արձանագրությունները, որոնք հիմնված են նուկլեինաթթուների կոշտ ֆազայի սորբցիայի մեթոդի վրա՝ օգտագործելով GPSpin Plant DNA Kit և GPSpin Plant RNA Kit

կոմերցիոն հավաքածուները (Genetic Analysis Strategies S.L., Իսպանիա): Այս հավաքածուները ապահովում են բարձր որակի նուկլեինաթթուների ստացում, ինչը հաստատվում է A260/A280 օպտիկական խտության 1,6–1,9 հարաբերակցությամբ ԴՆԹ-ի և 1.8–2.1 ՌՆԹ-ի համար:

Աղյուսակ 5-ում ներկայացված են այդ հավաքածուների բաղադրիչները, դրանց ֆունկցիաները և նուկլեինաթթուների մեկուսացման մեխանիզմները:

**Աղյուսակ 4. Պաթոգենների դասակարգումը ըստ նուկլեինաթթվի տեսակի**

Պաթոգենի տեսակը	Պաթոգենի անվանումը
ԴՆԹ-պարունակող	Մնկային՝ <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Phytophthora infestans</i> և այլն
	Բակտերիալ՝ <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Erwinia amylovora</i> և այլն
	Վիրուսային՝ <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV, ցեղ <i>Begomovirus</i> )
ՌՆԹ-պարունակող	Վիրուսային՝ <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV, ցեղ <i>Tobamovirus</i> ), <i>Pepino mosaic virus</i> (PMV, ցեղ <i>Potexvirus</i> ), <i>Tomato brown rugose fruit virus</i> (TBRFV, ցեղ <i>Tobamovirus</i> ), <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV, ցեղ <i>Orthotospovirus</i> ), <i>Tomato mosaic virus</i> (TMV, ցեղ <i>Tobamovirus</i> ), <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV, ցեղ <i>Tobamovirus</i> ), <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV, ցեղ <i>Cucumovirus</i> ) և այլն

## Արձանագրություններ (պրոտոկոլներ)

### Մեթոդ A. ԴՆԹ մեկուսացում CTAB բուֆերի հիման վրա (GPSpin Plant DNA Kit)

1. Մանրացնել 180–200 մգ բուսական հյուսվածք և ավելացնել 1200 մկլ CTAB (Lysis Buffer) լուծույթ: Խառնուրդը լցնել 2 մլ միկրոանոթի (Eppendorf) մեջ և խառնել վորտեքսով 20 վայրկյան:
2. Անոթը տեղադրել 30–45 րոպե տևողությամբ թերմոբլոկում 80°C պայմաններում: Ընթացքում պարբերաբար խառնել վորտեքսով:
3. Ցենտրիֆուգացնել 14 000 պտ/րոպե 10 րոպե, որից հետո առանձնանում է մակերեսային լիպիդային շերտը: Այնուհետև մեծ զգուշությամբ (վերին շերտը չխառնելով) վերցնել 700 մկլ սուպերնատանտ (առաջացած նստվածքի վրայի հեղուկ շերտ), և տեղափոխել նոր միկրոանոթ:
4. Վերցրած սուպերնատանտի լուծույթին ավելացնել 700 մկլ Lysis/Binding Buffer և 20 մկլ Proteinase K, լավ խառնել:
5. Պահել խառնուրդը 10 րոպե թերմոբլոկում 70 °C:
6. Այնուհետև խառնուրդին ավելացնել 300 մկլ իզոպրոպանոլ և խառնել:
7. Ստացված խառնուրդից (լիզատից) վերցնել 750 մկլ և լցնել MiniSpin Column անոթի մեջ որը իր հերթին տեղադրված է հավաքող անոթի մեջ:
8. Տեղադրել ցենտրիֆուգայում 60 վայրկյան 12 000 պտ/րոպե արագությամբ:

9. Հավաքման անոթից հեղուկը թափել:
10. Մնացած լիզատի լուծույթի հետ կատարել 7–9 կետերում նշված գործողությունները:
11. Անոթին ավելացնել 500 մկլ Desinhibition Buffer և տեղադրել ցենտրիֆուգա 10 000–12 000 պտ/րոպե արագությամբ 60 վայրկյան տևողությամբ:
12. Հավաքման անոթից հեղուկը թափել:
13. - Առաջին լվացում. ավելացնել անոթի մեջ 500 մկլ Լվացող/ Wash Buffer և տեղադրել ցենտրիֆուգա 14 000 պտ/րոպե արագությամբ 60 վայրկյան տևողությամբ:
14. Հավաքման անոթից հեղուկը թափել:
15. - Երկրորդ լվացում. Կրկնել 13 կետի գործողությունը:
16. Մնացորդային սպիրտի հեռացման համար անոթը տեղադրել ցենտրիֆուգա ամենաբարձր (16 000 պտ/րոպե) արագությամբ 2 րոպե տևողությամբ:
17. Փոխել հավաքող անոթը:
18. Վերցնել 50–100 մկլ (նախընտրելի մոտ 70 մկլ) Elution Buffer և առանձին տաքացնել մինչև 70 °C:
19. Տաքացված Elution Buffer-ը ավելացնել անոթին և ինկուբացնել 1 րոպե 70 °C–ում, ապա տեղադրել ցենտրիֆուգա ամենաբարձր արագությամբ 1 րոպե:
20. Կրկնել նույն գործողությունը անոթին ավելացնելով նախապես տաքացված Elution Buffer-ը:
21. Հավաքվող անոթում ստացված էլյուատի լուծույթը հետագա անալիզների համար պարունակում է մեկուսացված մաքուր ԴՆԹ:

22. Մեկուսացված ԴՆԹ-ն կարող է պահպանվել կարճաժամկետ՝  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  կամ երկարաժամկետ՝  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  պայմաններում:

***CTAB-բուֆերի պատրաստում (1լ հաշվարկով):***

Tris-HCl (pH 8.0) – 100 մՄ

NaCl – 1.4 Մ

EDTA (pH 8.0) – 20 մՄ

CTAB (Ցետիլտրիմեթիլամոնիում բրոմիդ) – 2%

**ՄԵԹՈԴ Ե. ԴՆԹ մեկուսացում SDS բուֆերի հիման վրա  
(GPSpin Plant DNA Kit)**

1. Բուսական հյուսվածքին 180–200 մգ-ին ավելացնել 1000 մլլ Extraction Buffer և 200 մլլ PVP Solution և մանրացնել: Խառնուրդը լցնել 2 մլ միկրոանոթի մեջ և խառնել վորտեքսով 20 վայրկյան:
2. Խառնուրդին ավելացնել 200 մլլ Lysis Solution SDS և ինկուբացման համար տեղադրել թերմոբլոկում  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  30–45 րոպե տևողությամբ: Եթե Lysis Solution SDS-ում առաջացել է նստվածք, անհրաժեշտ է այն լուծել տաքացնելով  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ում:
3. Ցենտրիֆուգացնել 14 000 պտ/րոպե արագությամբ 5 րոպե:
4. Հավաքված սուպերնատանտը զգուշորեն տեղափոխել 2 մլ նոր միկրոանոթի մեջ, ավելացնել 200 մլլ Precipitation Buffer և ինկուբացնել  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ում 3 րոպե:

5. Կրկին ցենտրիֆուգացնել 14000 պտ/րոպե արագությամբ 5 րոպե: Առաջանում է նստվածք և մակերեսային շերտ: Միջին հատվածից զգուշորեն վերցնել 600–700 մկլ սուպերնատանտ և տեղափոխել նոր անոթի մեջ:
6. Սուպերնատանտին ավելացնել 600–700 մկլ Lysis/Binding Buffer և 20 մկլ Proteinase K և խառնել: Ինկուբացնել 70 °C-ում 10 րոպե:
7. Խառնուրդին ավելացնել 300 մկլ իզոպրոպանոլ և խառնել վորտեքսով:
8. Ստացված լուծույթից վերցնել 750 մկլ և տեղափոխել MiniSpin Column անոթ: Ցենտրիֆուգացնել 12 000 պտ/րոպե արագությամբ 60 վայրկյան:
9. Կրկնել 8-րդ կետի գործողությունը մնացած 750 մկլ լուծույթի համար: Հավաքող անոթը հեռացնել:
10. MiniSpin Column անոթը տեղադրել նոր հավաքող անոթի մեջ, ավելացնել 500 մկլ DesInhibition Buffer և ցենտրիֆուգացնել 10000–12000 պտ/րոպե արագությամբ 60 վայրկյան: Էլյուատը հեռացնել:
11. - Առաջին լվացում. ավելացնել 500 մկլ Wash Buffer, ցենտրիֆուգացնել 14 000 պտ/րոպե արագությամբ 60 վայրկյան և հեղուկը հեռացնել:
12. - Երկրորդ լվացում. կրկնել 11-րդ կետի գործողությունը:
13. Անոթից մնացած սպիրտը ամբողջական հեռացման համար ցենտրիֆուգացնել առավելագույն արագությամբ 2 րոպե:

14. MiniSpin Column-ը տեղափոխել մաքուր հավաքող անոթ: Ավելացնել 50–100 մկլ նախապես մինչև 70 °C տաքացված Elution Buffer: Ինկուբացնել 1 րոպե:
15. Ցենտրիֆուգացնել առավելագույն արագությամբ 60 վայրկյան:
16. Կրկին ավելացնել 50–100 մկլ Elution Buffer (տաքացված մինչև 70 °C), ինկուբացնել 1 րոպե և կրկին ցենտրիֆուգացումը առավելագույն արագությամբ 60 վայրկյան:
17. Ստացված էլյուատը պարունակում է մաքուր մեկուսացված ԴՆԹ, որը պատրաստ է հետագա անալիզների համար:
18. Մեկուսացված ԴՆԹ-ն կարող է պահպանվել կարճաժամկետ՝ –20 °C-ում կամ երկարաժամկետ՝ –80 °C-ում:

**Բուսական նմուշներից ՌՆԹ-ի մեկուսացում  
(GPSpin Plant RNA Kit)**

1. Հեղուկ ազոտում սառեցված 100 մգ թարմ կամ 25 մգ չոր բուսական հյուսվածք մանրացնել: Ավելացնել 400 մկլ Lysis Buffer, 40 մկլ PVP Solution և 4 մկլ β-մերկապտոէթանոլ: Ստացված խառնուրդը լցնել 2 մլ միկրոանոթի մեջ:
2. Խառնուրդը միատարր դարձնել հոմոգենիզատորով կամ անցկացնել ներարկիչի 20G (0.9 մմ) ասեղի միջով մոտ 10 անգամ:

3. Ինկուբացնել 5 րոպե սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:
4. Ավելացնել 30 մկլ Precipitation Buffer, խառնել վորտեքսով և ինկուբացնել 1 րոպե սենյակային ջերմաստիճանում:
5. Ցենտրիֆուգացնել առավելագույն արագությամբ՝ 14 000–16 000 պտ/րոպե 3 րոպե տևողությամբ:
6. Մուպերնատանտը տեղափոխել gDNA Removal Column անոթ և դնել հավաքող անոթի մեջ:
7. Ցենտրիֆուգացնել 8 000 պտ/րոպե արագությամբ 1 րոպե:
8. Հեռացնել Column անոթը, իսկ հեղուկին ավելացնել 350 մկլ 100% էթանոլ և խառնել:
9. Խառնուրդը տեղափոխել RNA Column անոթ, տեղադրել հավաքող անոթի մեջ և ցենտրիֆուգացնել 8000–10000 պտ/րոպե արագությամբ 1 րոպե:
10. Էլյուատը հեռացնել:
11. -Առաջին լվացում. ավելացնել 100 մկլ Wash Buffer: Ցենտրիֆուգացնել 1 րոպե տևողությամբ առավելագույն արագությամբ : Էլյուատը հեռացնել:
12. -Երկրորդ լվացում. ավելացնել 700 մկլ Wash Buffer: Ցենտրիֆուգացնել առավելագույն արագությամբ 1 րոպե: Էլյուատը հեռացնել:
13. Մնացած էթանոլի ամբողջական հեռացման համար լրացուցիչ ցենտրիֆուգացնել 14 000–16 000 պտ/րոպե արագությամբ ևս 3 րոպե:
14. Անոթը տեղափոխել մեկ այլ մաքուր 1.5-2 մլ միկրոանոթ:
15. Ավելացնել 30 մկլ մաքուր ՌՆԱզ-ից զերծ ջուր, ինկուբացնել 2 րոպե սենյակային ջերմաստիճանում:

16. Ցենտրիֆուգացնել առավելագույն արագությամբ 1 րոպե:
17. Անհրաժեշտության դեպքում (ՌՆԹ-ի ելքը բարձրացնելու համար) կարելի է կրկնել էյուացման գործողությունը՝ ավելացնելով ևս 30 մկլ ՌՆագ-ից գերծ ջուր:

Էյուատից ԴՆԹ-ի լրացուցիչ հեռացումը հնարավոր է իրականացնել ռեակցիոն բուֆերի մեջ ավելացնելով 2 մկլ ԴՆագ I ֆերմենտը և ինկուբացնել 10 րոպե սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում: Սակայն վիրուսային ՌՆԹ-ի հայտնաբերման համար, շատ դեպքերում, ԴՆԹ-ի հեռացման այս փուլը պարտադիր չէ:

**Աղյուսակ 5. Հավաքածուների բաղադրիչների նշանակությունը և գործողության մեխանիզմները նուկլեինաթթուների առանձնացման ժամանակ**

Բաղադրիչ	Մեկուսացում	Գործողության մեխանիզմ
<b>Սառեցում հեղուկ ազոտով</b>	ԴՆԹ / ՌՆԹ	Բուսական հյուսվածքների փխրում, արագ մանրացում, բարձրացում է նուկլեինաթթուների արդյունքի արդյունավետությունը (ելը):
<b>CTAB բուֆեր</b> (ցետիլտրիմեթիլամոնիում բրոմիդ + NaCl-ի բարձր խտություն)	ԴՆԹ	Քայքայվում են բջջային մեմբրանները, հեռացվում են լիպիդները և պոլիսախարիդները: NaCl-ն կանխարգելում է ԴՆԹ-ի կոագուլյացիան CTAB-ի հետ:

<p><b>Extraction Buffer + PVP</b> (պուլիվինիլ-պիրրոլիդոն) (SDS-մեթոդ)</p>	<p>ԴՆԹ</p>	<p>Բջջիջների լիզիս, պուլիֆենոլների հնհիբիցիայի կանխարգելում, նուկլեինաթթուների կոնդենսացիա, նստվածքի տեղափոխում սյունակներին:</p>
<p><b>PVR / PVRS Buffer + <math>\beta</math>-ME</b> (<math>\beta</math>-մերկապտոէթանոլ )</p>	<p>ԴՆԹ/ ՌՆԹ</p>	<p>Լիզիս, նուկլեազների անջատում, սպիտակուցների դենատուրացում: <math>\beta</math>-ME շնորհիվ ՌՆԹ պաշտպանություն՝ անջատվում է ՌՆԱզ-ը և դենատուրացվում սպիտակուցները:</p>
<p><b>Proteinase K</b> (սերինային/սերինանման պրոտեազ) + <b>ինկուբացիա 70–80 °C-ում</b></p>	<p>ԴՆԹ</p>	<p>Քայքայում է սպիտակուցները, այդ թվում՝ սպիտակուցային համալիրները՝ ԴՆԹ/ՌՆԹ-կապող նուկլեազները: 70 °C-ում Proteinase K-ի ակտիվությունը պահպանվում է և արագացնում սպիտակուցների դենատուրացիան, բարձր ջերմաստիճանը նաև նպաստում է դետերգենտների լուծմանը:</p>
<p><b>Ցենտրիֆուգացում</b></p>	<p>ԴՆԹ/ ՌՆԹ</p>	<p>Շերտերի բաժանում, լիպիդային/պուլիսախարիդային շերտի հեռացում:</p>

<b>Իզոպրոպանոլ / Էթանոլ</b>	ԴՆԹ/ ՌՆԹ	Իզոպրոպանոլը նվազեցնում է ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի լուծելիությունը: Այն օգտագործվում է նաև ԴՆԹ-ի կապումը սիլիցիումային մեմբրանի հետ: Էթանոլը հեշտացնում է ՌՆԹ-ի սորբցիան և աղտոտվածքների հեռացումը:
<b>Lysis / Binding Buffer</b>	ԴՆԹ	Պարունակում է օրգանական բաղադրիչներ և բարձր խտությամբ աղեր, որոնք նպաստում են ԴՆԹ-ի սորբցիան սիլիցիումի մեմբրանի վրա, ինհիբիտորների հեռացում:
<b>MiniSpin Column / PV Column</b> (սիլիցիումի մեմբրանով)	ԴՆԹ/ ՌՆԹ	ԴՆԹ/ՌՆԹ մոլեկուլները սորբցվում են սիլիցիումի մեմբրանի մակերեսին, իսկ աղտոտված նյութերը հեռացվում լվացման ժամանակ:
<b>Desinhibition Buffer</b>	ԴՆԹ	ՊՇՌ ինհիբիտորները (պոլիֆենոլներ, հումինաթթուներ) կապում է և հեռացնում:
<b>Elution Buffer</b>	ԴՆԹ/ ՌՆԹ	Իոնային ուժի նվազեցումը քայքայում է ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի կապը սիլիցիումի մեմբրանի հետ:
<b>ԴՆազ I</b>	ՌՆԹ	ԴՆԹ-ի հեռացում ՌՆԹ-նմուշներից

## 4. ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդի իրականացում

### 4.1. Ռեակցիոն խառնուրդի պատրաստում և ամպլիֆիկացման ռեժիմ

---

Նուկլեինաթթուների առանձնացումից հետո ՊՇՌ-բոքսում պատրաստվում է ռեակցիոն խառնուրդը, որը նախատեսված է թիրախային ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի ամպլիֆիկացման համար:

Ընդհանուր ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը կազմում է 20 մկլ և ներառում է.

ԻԺ-ՊՇՌ-ի համար

- 10 մկլ ջուր (ազատ ԴՆԱզ/ ՌՆԱզ ֆերմենտներից),
- 4 մկլ MixStable qPCR 5x- իրենից ներկայացնում է օպտիմալացված բուֆերային համակարգ, որը պարունակում է Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> աղեր, դՆՏՖ-ի խառնուրդ (դԱՏՖ, դՏՏՊ, դԳՏՊ, դՏՏՖ), թերմոկայուն ԴՆԹ պոլիմերազա և ֆլուորեսցենտային բաղադրիչներ:
- 1 մկլ հատուկ պրայմերների խառնուրդ և մարկերների խառնուրդ -թիրախային պաթոգեն տեսակներ (TargetSpecies) ԴՆԹ-ի կապի և սինթեզի համար (օրինակ՝ FusOxy Primers & Probe Mix, 10x),
- 5 մկլ ԴՆԹ – բուսական հյուսվածքներից մեկուսացված նուկլեինաթթու:

ՀՏ-ԻԺ-ՊՇՌ-ի համար՝

- 10 մկլ qPCR Probe Master Mix (2x)- օպտիմալացված բուֆերային համակարգ,

- 2 մկլ RT Mix- ներառում է հակադարձ տրանսկրիպտազա, ՌՆԹ-ազի ինհիբիտոր և համապատասխան բուֆերային համակարգ, որը ապահովում է ՌՆԹ-ից կԴՆԹ-ի արդյունավետ սինթեզ,
- 1 մկլ հատուկ պրայմերների և մարկերների խառնուրդ (օրինակ՝ PepMV Primers & Probe Mix, 10×),
- 2–5 մկլ ՌՆԹ,
- ջուր (ազատ նուկլեազներից), ավելացնել այնքան, որ ամբողջական ծավալը կազմի 20 մկլ:

Արդյունքների հուսալիությունը վերահսկելու համար յուրաքանչյուր անալիզի համար իրականացվում են՝

-Դրական ստուգիչ (ԴՍ, Positive Control)- պարունակում է հայտնի քանակությամբ նպատակային պաթոգենի ԴՆԹ/ՌՆԹ,

-Բացասական ստուգիչ (ԲՍ, NTC, No Template Control)- ներառում է ռեակցիայի բոլոր բաղադրիչները, բացի ԴՆԹ-ից:

Դրական ստուգիչը թույլ է տալիս համոզվել, որ ռեակցիան իրականանում է ճիշտ, իսկ բացասական ստուգիչը հայտնաբերում է հնարավոր աղտոտումը կամ ոչ յուրահատուկ ամպլիֆիկացիան:

Ամպլիֆիկացիան իրականացվում է LightCycler 96 (Roche, Գերմանիա) ամպլիֆիկատորում: Ռեժիմը ներառում է հետևյալ փուլերը՝

Փուլ	Ժամ-ակ	Ջերմ-ան	Ցիկլերի քանակ	Ռեգիստրացիայի կանալ
Հակադարձ տրանսկրիպցիա (ավելանում է միայն ՀԿ-ԻԺ-ՊՇՌ-ի համար)	20 ր	50 °C	1	-
Ակտիվացում ՊՇՌ/ ՀԿ-ԻԺ-ՊՇՌ	15 ր / 5 ր	95 °C	1	-
Դենատուրացիա ՊՇՌ/ ՀԿ-ԻԺ-ՊՇՌ	15 վրկ / 5 վրկ	95 °C	} 40	FAM - թիրախ
Հիբրիդացում, էլոնգացիա և տվյալների գրանցում ՊՇՌ/ ՀԿ-ԻԺ-ՊՇՌ	1 ր / 30վրկ	60 °C		

## 4.2. Ստանդարտ լուծույթների պատրաստում և արդյունքների վերլուծություն

Նպատակային նմուշների պաթոգեն ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի քանակական գնահատման համար պատրաստվում են նուկլեինաթթուների հայտնի կոնցենտրացիայով ստանդարտների հաջորդական նոսրացումներ: Կատարում են հիմնականում 5–7 նոսրացումներ՝ յուրաքանչյուրը 2 կամ 10 անգամ:

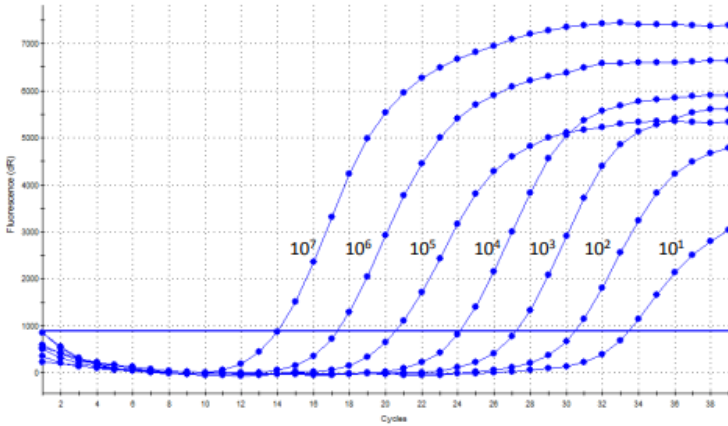
Ամպլիֆիկացման արդյունքների հիման վրա կառուցվում է կալիբրացիոն կոր, որը օգտագործվում է՝

1. Ct-ի ինտերպոլյացիայի միջոցով նմուշներում նպատակային թիրախի կոնցենտրացիայի որոշման համար,
2. Կորի թեքության շնորհիվ ամպլիֆիկացման ռեակցիայի արդյունավետության գնահատման համար,
3. Մեթոդի վերարտադրելիության և գծայնության ստուգման համար (կորելացիոն գործակիցը՝  $R^2$  պետք է գերազանցի 0,99):

Ստանդարտ նոսրացումների ճիշտ պատրաստումը և կալիբրացիոն կորի կառուցումը կարևոր են բուսական հյուսվածքներում պաթոգենների կոնցենտրացիայի ճշգրիտ քանակական գնահատման համար (Աղ. 6, նկ. 6):

**Աղյուսակ 6. Ct-ի կալիբրացիոն արժեքները ԴՆԹ-ի ստանդարտ նոսրացումների ժամանակ**

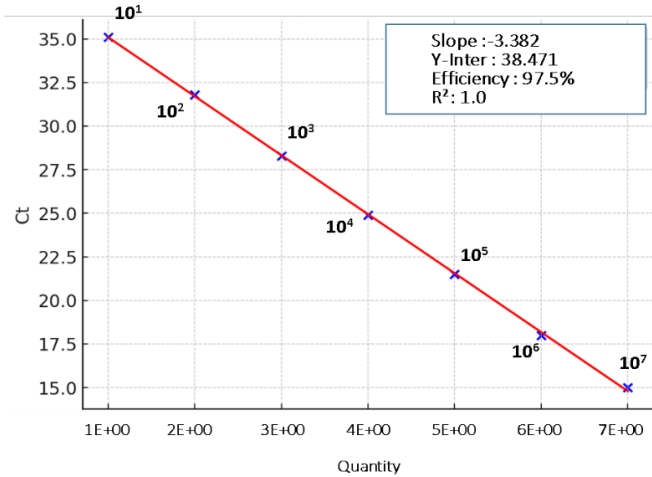
Նոսրացումներ	ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիա (ԴՆԹ-ի պատճեններ / 1 մկլ ռեակցիոն խառնուրդում)	Ct-ի միջին ցուցանիշ
$10^0$	$1 \times 10^7$	15,0
$10^1$	$1 \times 10^6$	18,0
$10^2$	$1 \times 10^5$	21,5
$10^3$	$1 \times 10^4$	24,9
$10^4$	$1 \times 10^3$	28,3
$10^5$	$1 \times 10^2$	31,8
$10^6$	$1 \times 10^1$	35,1



**Նկ. 6. Ct-ի կալիբրացիոն կորերը ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի ստանդարտ նոսրացումների ժամանակ**

Այս ընթացքում սարքից անմիջապես անհրաժեշտ է ԻԺ-ՊՇՌ-ի ծրագրային ապահովման մեջ որպես ստանդարտ (Standard) սահմանել հայտնի պատճենների քանակով ստանդարտ նոսրացումների հաջորդականությունը:

Այս տվյալների հիման վրա կառուցվում է կալիբրացիոն կոր, որտեղ X առանցքի վրա նշվում է ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի լոգարիթմը, իսկ Y-ի վրա՝ Ct արժեքը (նկ. 7):



**Նկ. 7. ԴՆԹ քանակի լոգարիթմի և Ct արժեքների միջև կապը**

Այս գծային ռեգրեսիան նկարագրվում է ուղիղ գծի հավասարումով՝

$$Ct = Y_{inter} + Slope \times \log(copy\ number)$$

Գծի անկյունային գործակիցը (Slope) հնարավորություն է տալիս գնահատել ամպլիֆիկացիայի արդյունավետությունը (E) հետևյալ բանաձևով՝

$$E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100\%$$

Ամպլիֆիկացիայի արդյունավետությունը համարվում է օպտիմալ 90–110 % տիրույթում: Ինհիբիտորների, ադտոտիչների կամ ոչ համապատասխան պայմանների

առկայության դեպքում ամպլիֆիկացման արդյունավետությունը նվազում է, ինչի հետևանքով ոչ ճիշտ է որոշվում թիրախային ԴՆԹ-ի քանակը:

Հարաբերակցական գործակիցը  $R^2 \geq 0,99$  հաստատում է գծայնությունը և քանակական վերլուծության ճշգրտությունը:

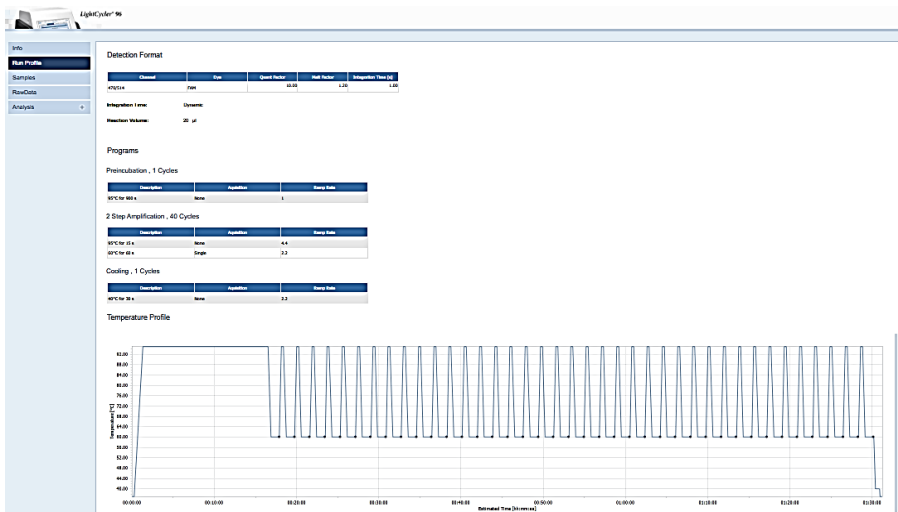
Ինչպես երևում է Նկ. 6-ից, ստանդարտ կորի անկյունային գործակիցը (Slope) կազմում է  $-3,38$ , իսկ Y-ի հատումը՝ (Y-intercept)  $38,4$ : Ամպլիֆիկացիայի արդյունավետությունը (E) կազմում է  $97,5\%$ , դետերմինացիայի գործակիցը՝  $R^2 = 1,0$ :

Ստանդարտ ուղիղ գծի ցուցանիշները օգտագործելով, հնարավոր է Ct արժեքը օգտագործել փորձարկվող նմուշի թիրախային ԴՆԹ-ի պատճենների քանակի հաշվարկներում՝

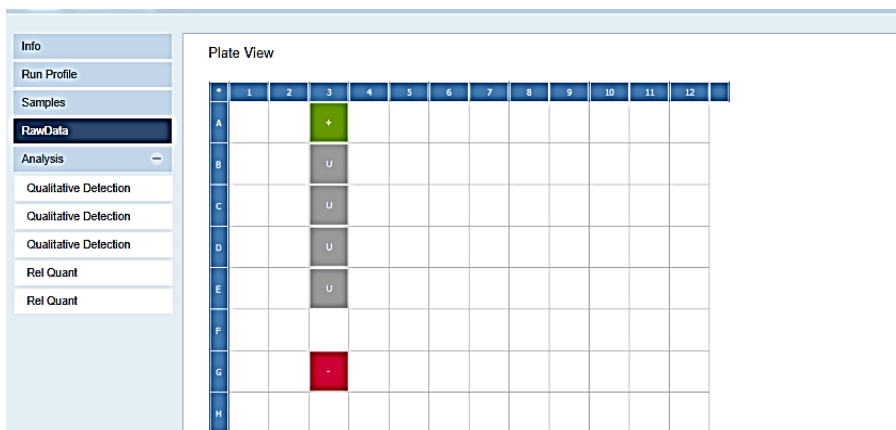
$$\text{Copy number} = 10^{\frac{Ct - Y_{\text{inter}}}{\text{Slope}}}$$

Ժամանակակից ամպլիֆիկատորներում ստանդարտ կորի կառուցումն ու ամպլիֆիկացիայի արդյունավետության ցուցանիշների հաշվարկը կատարվում է ավտոմատ կերպով, ինչը զգալիորեն արագացնում և հեշտացնում է վերլուծության գործընթացը:

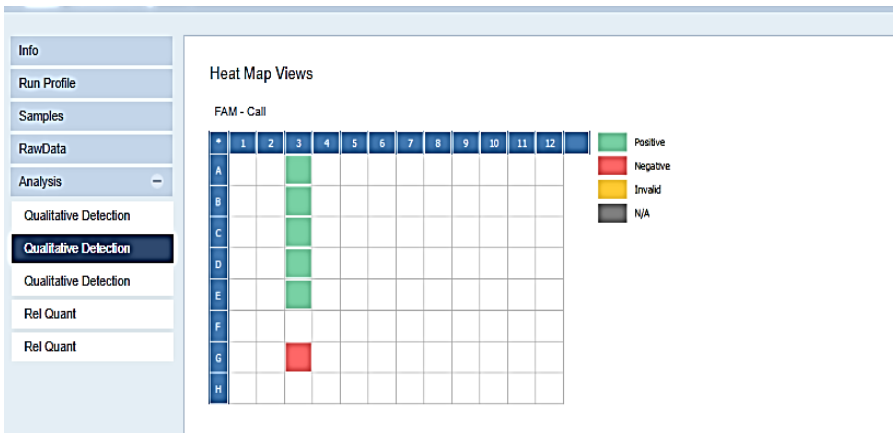
Որպես օրինակ, չորս բուսական նմուշներում (Sample 1–4), ներկայացված է LightCycler 96 (Roche) ամպլիֆիկատորից ստացված *Fusarium oxysporum* պաթոգենի ախտորոշման հաշվետվության արդյունքները, օգտագործելով միաժամանակ դրական (Positive Control) և բացասական (Negative Control) ստուգիչները (նկ. 8):



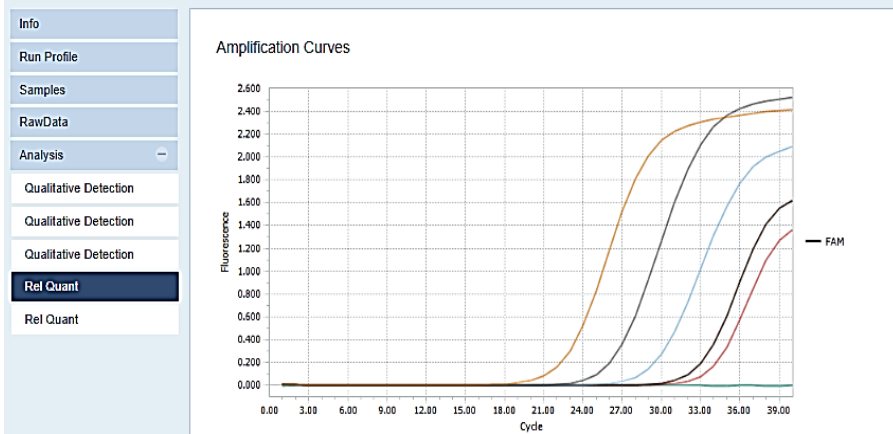
a.



b.



c.

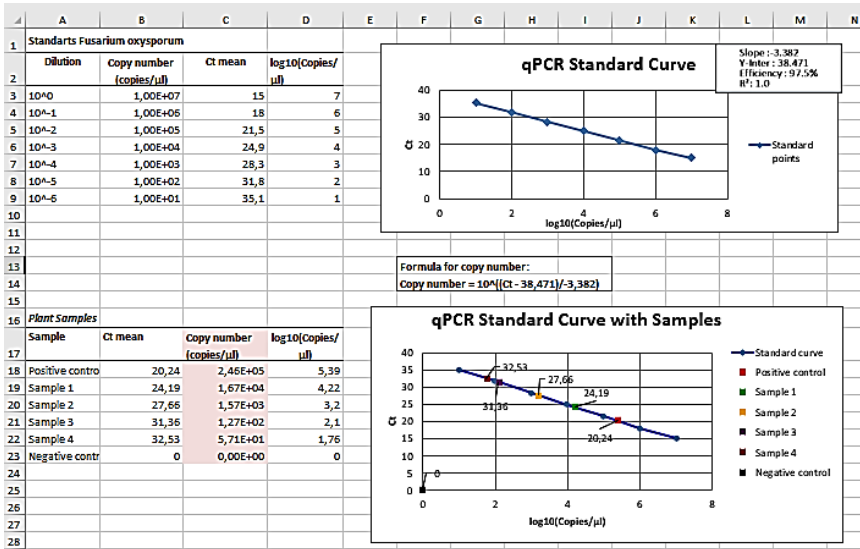


d.

**All Data**

Color	Position	Sample Name	Gene Name	Condition Name	Cq	Cq Mean	Cq Error	Excluded	Sample Type
Orange	A3	+	None		20.24	20.24	0.00	<input type="checkbox"/>	Positive control
Grey	B3	1	None		24.19	24.19	0.00	<input type="checkbox"/>	Unknown
Light Blue	C3	2	None		27.66	27.66	0.00	<input type="checkbox"/>	Unknown
Dark Blue	D3	3	None		31.36	31.36	0.00	<input type="checkbox"/>	Unknown
Red	E3	4	None		32.53	32.53	0.00	<input type="checkbox"/>	Unknown
Green	G3	5	None					<input type="checkbox"/>	Negative control

e.



f.

**Նկ. 8. *Fusarium oxysporum*-ի ախտորոշման հաշվետվություն**

- a. ամպլիֆիկացիայի պայմանները,
- b. պլանշետի գծապատկերը,
- c. ջերմային քարտը (FAM պլիք),
- d. ամպլիֆիկացիոն կորերը,
- e. Ct արժեքների տվյալները,
- f. ԴՆԹ-ի քանակի հաշվարկը ստանդարտ կորի և նրա ցուցանիշների հիման վրա:

Ինչպես երևում է հաշվետվությունից, ներկայացված հստակ ԻԺ-ՊՇՌ ամպլիֆիկացիոն կորերը (ըստ FAM պլիքի) վկայում են փորձի ճիշտ ընթացքի մասին: Դրական ստուգիչը ցույց է տալիս սպասված Ct-ի արժեքը՝ 20,24, մինչդեռ բացասական ստուգիչի դեպքում ամպլիֆիկացիա չի իրականացվել, ինչը հաստատում է փորձի թափանցիկությունն ու մաքրությունը: Չորս բուսական

նմուշներում գրանցվել են դրական ազդանշաններ: N1 և N2 նմուշներում Ct-ի արժեքը կազմել են համապատասխանաբար 24,19 և 27,66, ինչը համապատասխանում է  $2,45 \times 10^4$  և  $1,67 \times 10^3$  պաթոգեն ԴՆԹ-ի պատճեններին 1 մկլ ռեակցիոն խառնուրդում: N3 և N4 նմուշներում Ct-ի արժեքները հաեմատաբար ավելի բարձր են կազմելով 31,36 և 32,53, ինչը վկայում է պաթոգեն ԴՆԹ-ի ցածր կոնցենտրացիայի մասին և համապատասխանում է  $1,27 \times 10^2$  և  $5,71 \times 10^1$  պատճեններին/մկլ ռեակցիոն խառնուրդում:

### **4.3. Աղտոտվածություն և աստիպիկ ամպլիֆիկացիոն կորեր**

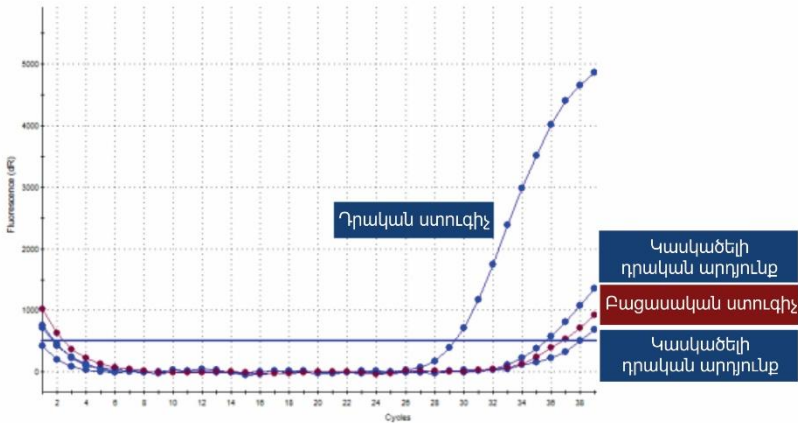
---

ԻԺ-ՊՇՌ-ի անալիզների ընթացքում հնարավոր են՝

**Աղտոտվածություններ:** ԻԺ-ՊՇՌ ընթացքում աղտոտվածությունները հայտնաբերվում են այն ժամանակ, երբ պաթոգենի ազդանշանը հատում է շեմային գիծը բացասական ստուգիչի (FU, NTC) սահմանում կամ երբ FU-ի գրաֆիկում հայտնվում է պիկ, որը համապատասխանում է պաթոգենին: Աղտոտման դեպքում արդյունքները համարվում են անվավեր, քանի որ անհնար է տարբերակել իսկապես դրական ազդանշանը աղտոտվածից: Կրկնակի աղտոտումը կանխելու նպատակով պետք է կրկնել կանխարգելիչ միջոցառումները:

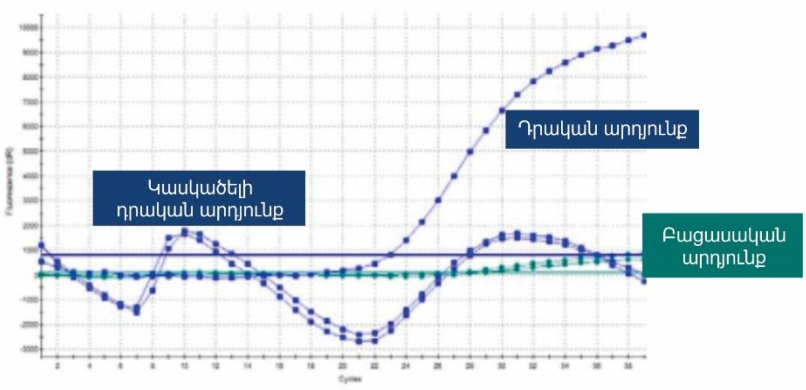
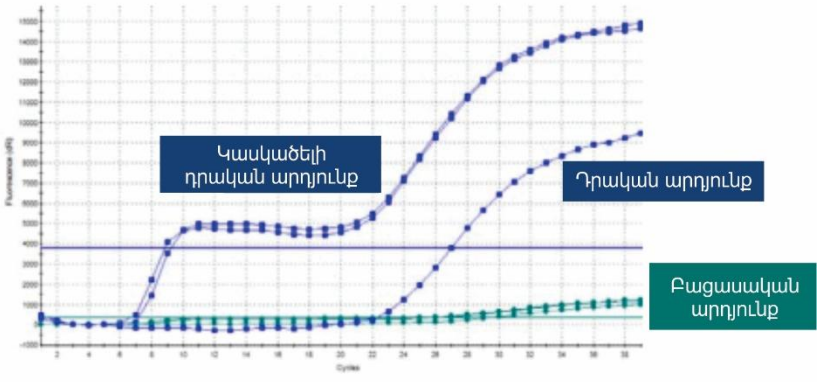
ԻԺ-ՊՇՌ մեթոդի բարձր զգայունության պատճառով որոշ բացասական նմուշներ կամ FU կարող են հատել շեմային գիծը 35-րդ ցիկլից հետո (նկ. 9): Այս թույլ ազդանշանի պատճառը կարող է լինել՝

- աղտոտվածությունը թիրախային ԴՆԹ-ի մեկուսացման գործընթացի ժամանակ,
- նմուշում պաթոգենի նվազագույն քանակի ներկայությունը:



**Նկ. 9. Կասկածելի ազդանշաններով և բացասական ստուգիչ նմուշում աղտոտմամբ ամպլիֆիկացիոն կորեր**

Ատիպիկ ամպլիֆիկացիոն կորերը կարող են առաջանալ, եթե մեկուսացված ԴՆԹ-ն պարունակում է նյութեր, որոնք ազդում են ֆլուորոֆորների ֆլուորեսցենտ ճառագայթման վրա կամ ազդանշանների հայտնաբերման ժամանակ: Յուրաքանչյուր կոր, որը չի արտացոլում ամպլիֆիկացման երեք ստանդարտ փուլերը (ինիցիացիայի, էքսպոնենցիալ և պլատո), պետք է բացառվի, և նմուշը պետք է վերլուծվի կրկին: Նկար 10-ում ներկայացված են ատիպիկ ամպլիֆիկացիոն կորերի օրինակները:



**Նկ. 10. Կասկածելի դրական ազդանշաններով ատիպիկ ամպլիֆիկացիոն կորերը**

## Գրականության ցանկ

1. Alvarez ML, Doné SC. SYBR Green and TaqMan quantitative PCR arrays: expression profile of genes relevant to a pathway or a disease state. *Methods Mol Biol.* 2014;1182:321-59. doi: 10.1007/978-1-4939-1062-5\_27.
2. Bikash Baral, DAS-ELISA-based detection and RT-PCR validation for precise and timely analysis of Citrus tristeza virus infection in Nepalese citrus species, *Current Research in Biotechnology*, Volume 7, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2024.100221>.
3. Campos, M.D.; Varanda, C.; Patanita, M.; Amaro Ribeiro, J.; Campos, C.; Materatski, P.; Albuquerque, A.; Félix, M.d.R. A TaqMan® Assay Allows an Accurate Detection and Quantification of *Fusarium* spp., the Causal Agents of Tomato Wilt and Rot Diseases. *Biology* 2023, 12, 268. <https://doi.org/10.3390/biology12020268>
4. Cao H, Shockey JM. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *J Agric Food Chem.* 2012 Dec 19;60(50):12296-303. doi: 10.1021/jf304690e.
5. de Chaves, M.Q.G., Morán, F., Barbé, S. et al. A new and accurate qPCR protocol to detect plant pathogenic bacteria of the genus ‘*Candidatus Liberibacter*’ in plants and insects. *Sci Rep* 13, 3338 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30345-0>
6. Gutiérrez-Aguirre I, Mehle N, Delić D, Gruden K, Mumford R, Ravnikar M. Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus. *J Virol Methods.* 2009;162(1-2):46-55. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.008>.
7. Haegi, A.; Luongo, L.; Vitale, S.; Tizzani, L.; Belisario, A. TaqMan qPCR Detection and Quantification of *Phytophthora cinnamomi* in Soil and Plant Tissues for Walnut Disease Management. *Agriculture* 2024, 14, 999. <https://doi.org/10.3390/agriculture14070999>

8. Haveman NJ, Schuerger AC, Yu P-L, Brown M, Doebler R, Paul A-L and Ferl RJ (2023) Advancing the automation of plant nucleic acid extraction for rapid diagnosis of plant diseases in space. *Front. Plant Sci.* 14:1194753. doi: 10.3389/fpls.2023.1194753
9. Jakomin, T.; Žunič, J.Z.; Kogovšek, P. Test Performance Study on qPCR Assays for Detection of *Phyllosticta citricarpa*. *Pathogens* 2025, 14, 413. <https://doi.org/10.3390/pathogens14050413>
10. Lukianova, A.A.; Evseev, P.V.; Stakheev, A.A.; Kotova, I.B.; Zavriev, S.K.; Ignatov, A.N.; Miroshnikov, K.A. Development of qPCR Detection Assay for Potato Pathogen *Pectobacterium atrosepticum* Based on a Unique Target Sequence. *Plants* 2021, 10, 355. <https://doi.org/10.3390/plants10020355>
11. Mehdi Jalali, Justyna Zaborowska, Morteza Jalali, Chapter 1 - The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR, *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, Academic Press, 2017, P. 1-18, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>.
12. Mehle, N.; Gregur, L.; Bogožalec Košir, A.; Dobnik, D. One-Step Reverse-Transcription Digital PCR for Reliable Quantification of Different Pepino Mosaic Virus Genotypes. *Plants* 2020, 9, 326. <https://doi.org/10.3390/plants9030326>
13. <https://geneticpcr.com/>
14. Patel, Rhea; Mitra, Bappa; Vinchurkar, Madhuri; Adami, Andrea; Patkar, Rajul; Giacomozzi, Flavio; Lorenzelli, Leandro; Shojaei Baghini, Maryam. A review of recent advances in plant-pathogen detection systems, *Heliyon*, Volume 8, Issue 12, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11855>.
15. Sohlberg E, Virkajärvi V, Parikka P, Rämö S, Laitila A, Sarlin T. Taqman qPCR Quantification and Fusarium Community Analysis to Evaluate Toxigenic Fungi in Cereals. *Toxins (Basel)*. 2022;14(1):45. <https://doi:10.3390/toxins14010045>.