

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для контроля качества препаратов ДНК, полученных при
проведении исследований на наличие генетически-
модифицированных организмов (ГМО) растительного
происхождения в продуктах питания, сырье и кормах для
животных, путем выявления ДНК экзогенного внутреннего
контроля методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс[®] Плант-контроль-FL»

Формат FRT

Только для исследовательских и иных немедицинских целей

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



Только для исследовательских и
иных немедицинских целей

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРОВ «АНК-16» и «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия)	15

НАЗНАЧЕНИЕ

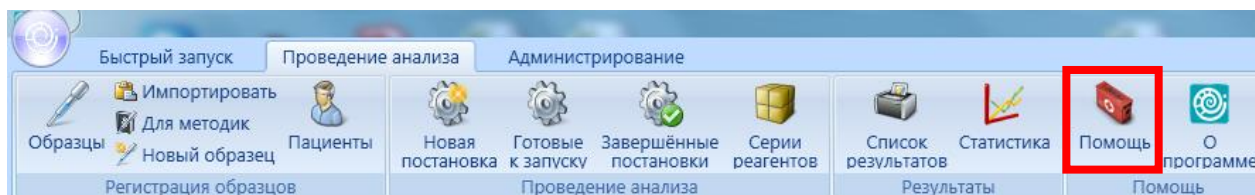
Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL» для контроля качества препаратов ДНК, полученных при проведении исследований на наличие генетически-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в продуктах питания, сырье и кормах для животных, с помощью выявления ДНК экзогенного внутреннего контроля (рекомбинантного препарата ВКО STI-87) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в режиме «реального времени» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия),
- «АНК-16», «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
Канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3

ВНИМАНИЕ! Программирование амплификатора и анализ результатов, полученных в программном обеспечении амплификатора, могут быть выполнены автоматически с помощью Программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия). Для работы следует использовать программу FRT Manager версии 2.0 или выше. **Для ознакомления со всеми возможностями ПО FRT Manager рекомендуем прочитать полное руководство пользователя. Данное руководство располагается в меню «Помощь» вкладки «Проведение анализа» ПО FRT Manager.**



См. также Методические Рекомендации по проведению амплификации и анализу результатов при помощи программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия).

¹ Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором Rotor-Gene 6000 – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000/для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При работе с прибором Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или пробирок на 0,1 мл.

Программирование амплификатора

1. Включить прибор.
2. Поместить пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene (ячейки карусели пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе). Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. Выбрать объем реакционной смеси и тип карусели:

Reaction volum/Объем реакции – 25 мкл

36-Well Rotor/36-луночный ротор

5. Нажать кнопку **Next/Далее**.
6. В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
7. Задать следующие параметры эксперимента:

Программа амплификации для приборов Rotor-Gene

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	10 с	–	40
	59	60 с	JOE/Yellow	

8. Нажать дважды кнопку **OK/Да**.

9. В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию** при 1-м шаге детекции. Для используемого красителя установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5FI** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10FI**. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.
10. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
11. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО STI-87 (канал JOE/Yellow):

1. Активировать нажатием в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
4. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
5. В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
6. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,1**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 1.

ДНК ВКО STI-87 обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow для него определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение (см. табл. 1). В этом случае результат амплификации является **положительным**, а качество экстракции ДНК – приемлемым для анализа ГМО в образце методом ПЦР.

Если сигнал амплификации ДНК ВКО STI-87 отсутствует или его значение не соответствует заданным критериям (см. табл. 1), результат амплификации является **отрицательным**.

Если причиной отрицательного результата предположительно является недостаточная очистка препарата ДНК от ингибиторов на этапе экстракции, рекомендуется снизить их концентрацию путём разбавления экстрагированного препарата ДНК в 5 раз, используя в качестве разбавителя ТЕ-буфер. Для разбавления отобрать 10 мкл выделенного препарата ДНК в чистую пробирку и добавить 40 мкл ТЕ-буфера, полученный раствор используется далее для повторного проведения ПЦР с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL». Если данная процедура не оказала заметного влияния на устранение ингибирования, а также, если на этапе экстракции были допущены ошибки, следует повторить экстракцию с добавлением ВКО STI-87 с последующим тестированием с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL».

Таблица 1

Результаты тестирования контрольных и исследуемых образцов

Тип образца	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t по каналу JOE/Yellow
		Rotor-Gene
Исследуемый образец	Экстракция ДНК	≤ 32
ОК	Экстракция ДНК	≤ 30
К+	ПЦР	≤ 30
К-	ПЦР	отсутствует

Возможные ошибки

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контроля ПЦР (**ТЕ-буфер**) свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных образцов считаются

недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных по используемому каналу детекции проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

2. Значение C_t для положительного контроля ПЦР (К+) отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 1). Требуется повторное исследование всех отрицательных проб, начиная с этапа амплификации.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора iCycler iQ5 рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых микропробирок для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, Ахуген, США).

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
2. Открыть программу iCycler или Bio-Rad iQ5, в зависимости от используемого прибора.
3. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналу **JOE/HEX/JOE-530**.
 - Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate Loading**. Задать объем реакции (**Sample Volume**): **25 мкл**, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
 - Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and Load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналу **JOE-530**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save This Plate Setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее **Plate Setup**, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with Selected Protocol**.
4. Задать программу амплификации.

Программа амплификации для приборов iCycler iQ/iQ5

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	15 с	–	42
	59	60 с	JOE/HEX/JOE-530	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановах можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
 - Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (например, GMO.tmo) и нажав кнопку **Save This Protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановах можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with Selected Plate setup**.
5. Поместить предварительно подготовленные пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.
- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
 - Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select Well Factor Source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume – 25 мкл**. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название

эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

6. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО STI-87 (канал JOE/HEX/JOE-530):

1. Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE/HEX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне 5-10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала K+. Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши.

Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.

2. Для прибора **iQ iCycler** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Установить уровень пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. Для этого пороговая линия устанавливается вручную на уровне 5-10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала K+. Чтобы установить уровень, пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения *Ct*.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 2.

ДНК ВКО STI-87 обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение (см. табл. 2). В этом случае результат амплификации является **положительным**, а качество экстракции ДНК –

приемлемым для анализа ГМО в образце методом ПЦР.

Если сигнал амплификации ДНК ВКО STI-87 отсутствует или его значение не соответствует заданным критериям (см. табл. 2), результат амплификации является **отрицательным**.

Если причиной отрицательного результата предположительно является недостаточная очистка препарата ДНК от ингибиторов на этапе экстракции, рекомендуется снизить их концентрацию путём разбавления экстрагированного препарата ДНК в 5 раз, используя в качестве разбавителя ТЕ-буфер. Для разбавления отобрать 10 мкл выделенного препарата ДНК в чистую пробирку и добавить 40 мкл ТЕ-буфера. Полученный раствор используется далее для повторного проведения ПЦР с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL». Если данная процедура не оказала заметного влияния на устранение ингибирования, а также, если на этапе экстракции были допущены ошибки, следует повторить экстракцию с добавлением ВКО STI-87 с последующим тестированием с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL».

Таблица 2

Результаты тестирования контрольных и анализируемых образцов

Тип образца	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct по каналу JOE/HEX/JOE-530*
		iCycler iQ, iQ5
Исследуемый образец	Экстракция ДНК	≤ 35
ОК	Экстракция ДНК	≤ 33
К+	ПЦР	≤ 33
К-	ПЦР	отсутствует

* Граничные значения Ct для приборов iCycler iQ и iQ5 соответствуют уровню пороговой линии 10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала К+.

Возможные ошибки

1. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля ПЦР (**ТЕ-буфер**) свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных образцов считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных по используемому каналу детекции проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение Ct для положительного контроля ПЦР (К+) отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 2), требуется повторное исследование всех отрицательных проб, начиная с этапа амплификации.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! В приборе используются только пробирки со сферическими крышками.

1. Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – например, **Плант-контроль** - и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный,
 - **Метод** – Пороговый (**Ct**),
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль –,
 - **Контроли**: положительный (К+) – 1 , отрицательный (К-) – 1,
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл,
 - **Флуорофор** – R6G – специфика. Канал R6G выбрать из выпадающего списка, заменив канал Нех, выставленный по умолчанию,
 - Задать программу амплификации (см. ниже) и нажать **ОК**.

Программа амплификации для прибора «ДТ-96»

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	10 с	–	40
	59	60 с	R6G	

2. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **Плант-контроль**, указать количество образцов и нажать **ОК**.
3. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.
4. Выбрать закладку **Запуск программы амплификации**, проверить параметры теста. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

5. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО STI-87 (канал R6G):

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct/Cp для всех каналов**.
2. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
3. Кнопка **Фитирование** (сглаживание кривых) должна быть **включена**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить критерии положительных результатов по нижней и верхней границам 10 %. Опцию **Нормализация данных** не использовать (галочка напротив соответствующей графы должна отсутствовать).
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне 5-10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала K+.
6. Результаты исследования (значения Ct) отображаются в таблице справа.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 3.

ДНК ВКО STI-87 обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу R6G для него определено значение порогового цикла Ct, не превышающее указанное граничное значение (см. табл. 3). В этом случае результат амплификации является **положительным**, а качество экстракции ДНК – приемлемым для анализа ГМО в образце методом ПЦР.

Если сигнал амплификации ДНК ВКО STI-87 отсутствует или его значение не соответствует заданным критериям (см. табл. 3), результат амплификации является **отрицательным**.

Если причиной отрицательного результата предположительно является недостаточная очистка препарата ДНК от ингибиторов на этапе экстракции, рекомендуется снизить их концентрацию путём разбавления экстрагированного препарата ДНК в 5 раз, используя в качестве разбавителя ТЕ-буфер. Для

разбавления отобрать 10 мкл выделенного препарата ДНК в чистую пробирку и добавить 40 мкл ТЕ-буфера, полученный раствор используется далее для повторного проведения ПЦР с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL». Если данная процедура не оказала заметного влияния на устранение ингибирования, а также, если на этапе экстракции были допущены ошибки, следует повторить экстракцию с добавлением ВКО STI-87 с последующим тестированием с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL».

Таблица 3

Результаты тестирования контрольных и анализируемых образцов

Тип образца	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t по каналу R6G
		«ДТ-96»
Исследуемый образец	Экстракция ДНК	≤ 35
ОК	Экстракция ДНК	≤ 33
К+	ПЦР	≤ 33
К-	ПЦР	отсутствует

Граничные значения C_t для прибора «ДТ-96» соответствуют уровню пороговой линии 10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала К+.

Возможные ошибки

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контроля ПЦР (**ТЕ-буфер**) свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных образцов считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных по используемому каналу детекции проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение C_t для положительного контроля ПЦР (К+) отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 3), требуется повторное исследование всех отрицательных проб, начиная с этапа амплификации.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРОВ «АНК-16» и «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия)

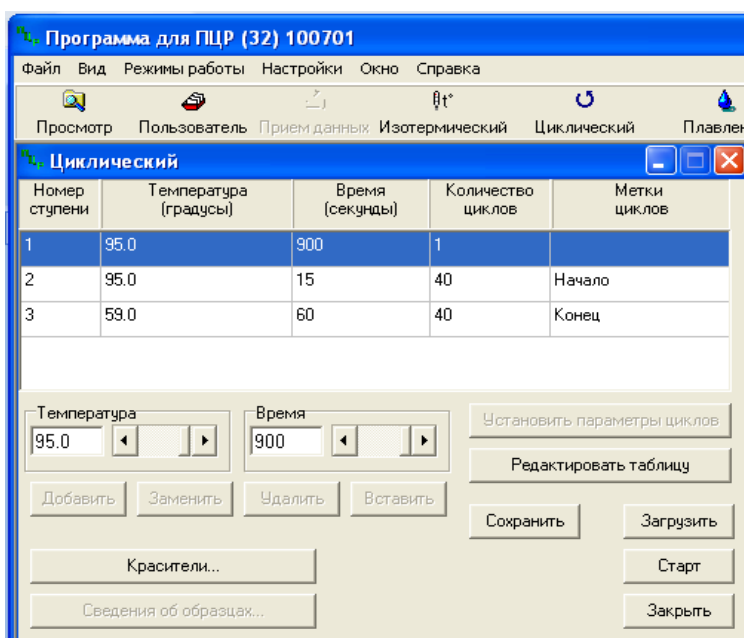
Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов.

Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Запустить программу **ПЦР**. Нажать клавишу **Активация** для прогрева крышки прибора. Время прогрева прибора составляет 15-20 минут.

ВНИМАНИЕ! В приборе используются только пробирки со сферическими крышками.

Создание программы амплификации

1. Выбрать пункт меню **Циклический**. В появившемся окне при нажатой (не активной) кнопке **Редактировать таблицу** задать программу амплификации:



2. Температура и время каждого шага/ступени амплификации устанавливаются в нижней половине окна, с помощью клавиатуры или бегунков. После установки каждого значения необходимо нажать кнопку **Заменить**. Для изменения количества шагов используются кнопки **Добавить**, **Удалить** и **Вставить**.
3. Для установки количества циклов в окне **Циклический** нажать кнопку **Установить параметры циклов**. В появившемся окне установить следующие значения **Начало** – шаг 2, **Конец** – шаг 3, **Количество циклов** – 40 и нажать кнопку **Применить**.
4. В том же окне (**Циклический**) нажать кнопку **Красители** и в появившемся списке отметить используемый канал детекции: **R6G**, затем нажать **ОК**.

- Для сохранения программы амплификации в окне **Циклический** выбрать **Сохранить**. В открывшемся окне выбрать **Создать пользователя** или выбрать пользователя из списка в левом верхнем углу. При создании пользователя задать имя пользователя и нажать **ОК**. Отметив в списке имя пользователя, нажать **Сохранить**. В появившемся окне ввести название программы (метода) (например, **Плант-контроль**) и нажать **ОК**.

Запуск амплификации

- Для запуска ранее созданной программы в окне **Циклический** выбрать **Загрузить**, соответствующего пользователя в левой части окна и название программы (метода) в правой, далее нажать **Загрузить**.
- В окне **Циклический** нажать кнопку **Сведения об образцах**. Задать названия образцов, используя строку ввода в правой части и кнопку **Задать** (над строкой ввода). С помощью функции **Кратность** можно указать число повторов одного образца (не более 3-х) для автоматического заполнения строк таблицы одноименными названиями. Тип всех образцов (список в правом верхнем углу) указывается, как **ИО** (испытуемый образец); этот тип образцов используется по умолчанию. После заполнения таблицы нажать **ОК**.
- Открыть крышку прибора и установить пробирки со сферическими крышками в соответствующие ячейки, закрыть и завинтить крышку. Ячейки нумеруются следующим образом (вид сверху):



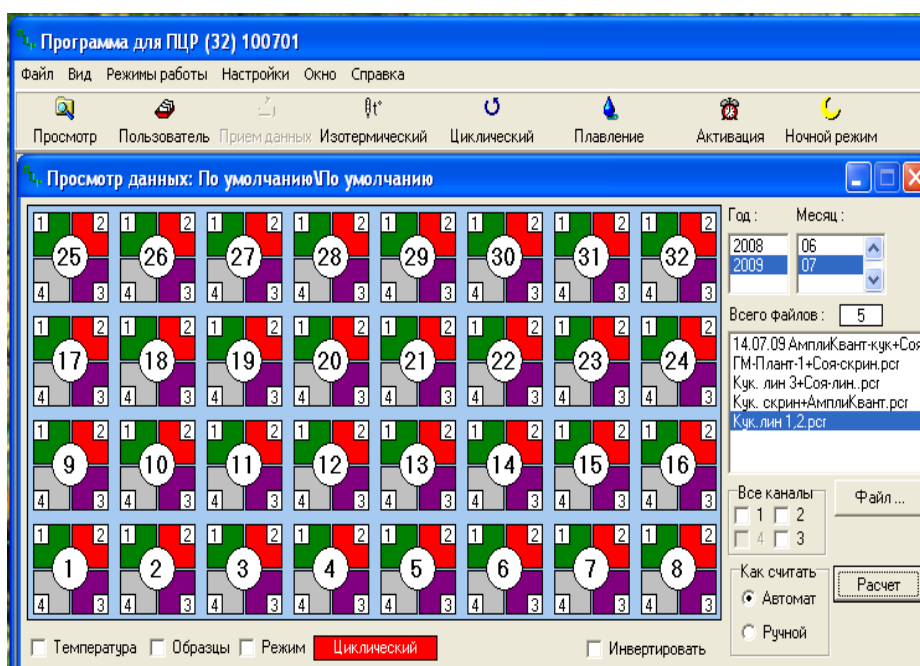
- Проверить правильность заданной программы и нажать **Старт** для запуска теста.
- При появлении окна **Проверка времени измерения**, выбрать 2, нажать **ОК**. После этого программа амплификации начнёт выполняться.
- После завершения амплификации перейти к анализу результатов.

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО STI-87 (канал R6G)

- В меню **Настройки** выбрать пункт **Расчет**. В открывшемся окне установить следующие значения параметров:

После установки параметров нажать **OK**. Данные установки сохранятся при следующем запуске программы **ПЦР**.

- Нажать кнопку **Просмотр**. Файлы результатов автоматически сохраняются во внутренние папки программной папки **FILES**, нумерованные соответствующим годом и месяцем постановки. Используемое по умолчанию имя файла содержит дату и время постановки (Число-Часы-Минуты-Секунды). Имя файла можно изменить через папку **FILES**. Файлы результатов имеют расширение *.pcr. В правой части окна выбрать год и месяц данной постановки, ниже из списка выбрать имя искомого файла результатов.



3. В окне **Просмотр данных** отметить галочкой пункт **Режим**. В появившемся окне в пункте **Номер ступени для расчета** выставить значение **3** (если выставлено другое значение). Закрыть окно **Режим**.
4. В окне **Просмотр данных** выставить режим **Автомат**, если он не выбран, далее нажать кнопку **Расчет**. Появится окно с нормированными графиками и значениями пороговых циклов для всех ячеек по использованному каналу детекции. Для перехода на другую страницу нажать на кнопку с цифрой (соответствующей номеру первой показываемой в списке образцов ячейки) в верхнем правом углу окна. Для печати или сохранения результатов в формате **.txt** нажать соответствующие кнопки в верхнем левом углу.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 4.

ДНК ВКО STI-87 обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу R6G для него определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение (см. табл. 4). В этом случае результат амплификации является **положительным**, а качество экстракции ДНК – приемлемым для анализа ГМО в образце методом ПЦР.

Если сигнал амплификации ДНК ВКО STI-87 отсутствует или его значение не соответствует заданным критериям (см. табл. 4), результат амплификации является **отрицательным**.

Если причиной отрицательного результата предположительно является недостаточная очистка препарата ДНК от ингибиторов на этапе экстракции, рекомендуется снизить их концентрацию путём разбавления экстрагированного препарата ДНК в 5 раз, используя в качестве разбавителя ТЕ-буфер. Для разбавления отобрать 10 мкл выделенного препарата ДНК в чистую пробирку и добавить 40 мкл ТЕ-буфера, полученный раствор используется далее для повторного проведения ПЦР с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL». Если данная процедура не оказала заметного влияния на устранение ингибирования, а также, если на этапе экстракции были допущены ошибки, следует повторить экстракцию с добавлением ВКО STI-87 с последующим тестированием с помощью набора реагентов «АмплиСенс® Плант-контроль-FL».

Таблица 4

Результаты тестирования контрольных и анализируемых образцов

Тип образца	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t по каналу R6G
		«АНК-16/32»
Исследуемый образец	Экстракция ДНК	≤ 32
ОКО	Экстракция ДНК	≤ 30
К+	ПЦР	≤ 30
К-	ПЦР	отсутствует

Возможные ошибки

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контроля ПЦР (**ТЕ-буфер**) свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных образцов считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных по используемому каналу детекции проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение C_t для положительного контроля ПЦР (К+) отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 4), требуется повторное исследование всех отрицательных проб, начиная с этапа амплификации.

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
08.09.12 IV	Титульная страница	Замена символа «Изделие для in vitro диагностики» на символ «Только для исследовательских целей»
	По тексту	Изменено написание каналов
25.07.13 ME	Назначение	Добавлена таблица «Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции»
	По тексту	Названия каналов детекции прописаны для каждой модели приборов в соответствии с протоколом № 20 от 26.02.13
29.01.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
04.02.15 PM	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
27.12.17 DV	Нижний колонтитул	Добавлен каталожный номер для Формы 1 REF G-2961-1
21.03.18 TA	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)	Добавлена информация про FRT manager
12.07.18 PM	По тексту	«Учет результатов» замен на «Интерпретация результатов»
13.02.19 TA	Проведение амплификации и анализ результатов при использовании приборов «АНК-16» и «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия)	Удалена фраза из раздела «Анализ результатов амплификации ДНК» для приборов «АНК-16» и «АНК-32», внесены правки по шаблону
22.04.20 MM	Титульный лист	Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»