

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для идентификации ДНК генетически модифицированной сои  
линий 40-3-2, А5547-127, А2704-12 в продуктах питания и  
кормах для животных методом полимеразной цепной реакции  
(ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

## «АмплиСенс<sup>®</sup> ГМ соя-линии-FL»

Только для исследовательских и иных немедицинских целей

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



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



Только для исследовательских и  
иных немедицинских целей

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	3
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	4
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	5
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ....	6
ФОРМАТ FRT .....	7
СОСТАВ.....	7
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	7
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	7
А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.....	7
Б. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).....	8
В. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора iQ iCycler и iQ5 (Bio-Rad, США).....	12
Г. Порядок проведения реакции амплификации, анализа и учета результатов при помощи прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).....	16
Д. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора «АНК-16»/«АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия) .....	17
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	21
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	24

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс<sup>®</sup> ГМ соя-линии-FL» не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для идентификации линий генетически модифицированной сои 40-3-2 (Roundup ready, устойчивой к глифосату, «Монсанто Ко», США), A5547-127 и A2704-12 (устойчивых к глифосинату аммония, «Байер КропСайенс», ФРГ) в продуктах питания и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Идентификация линии генетически модифицированной сои проводится в образцах ДНК после скрининга на наличие последовательности промотора 35S с помощью набора реагентов «АмплиСенс<sup>®</sup> ГМ соя-FL».

## ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

### Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

**Форма 2** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения ПЦР-амплификации и идентификации ДНК.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Использование формы комплектации 2

производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## **АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

### **Аналитическая чувствительность**

<b>Вид исследуемого материала</b>	<b>Комплект для выделения ДНК</b>	<b>Комплект для амплификации и детекции</b>	<b>Аналитическая чувствительность</b>
Рекомендованный для данного набора	«ДНК-сорб-С-М»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	10 копий ДНК /ПЦР

### **Аналитическая специфичность**

Отсутствует положительная реакция в тестах с ДНК не геномодифицированной сои, млекопитающих, птиц, рыб, других растений, а также с ДНК геномодифицированных линий кукурузы Vt-176, MON810, NK603, T25, GA21, MIR604, MON863, 3272, MON88017, Vt11.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования продуктов, содержащих растительные компоненты или растительное сырье, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в

соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

**ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

**Для проведения ПЦР-амплификации и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:**

1. Амплификатор, например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия); Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия); iCycler iQ (Bio-Rad, США); «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), «АНК-16»/«АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия) или эквивалентный.
2. Для прибора Rotor-Gene: одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, Ахуген, США).

Для приборов iCycler iQ, iQ5, «ДТ-96» и «АНК-16»/«АНК-32»: одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на

- 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, Ахуген, США), стрипованные пробирки с куполообразной крышкой или 96-луночный планшет для ПЦР, снабженный термостабильными оптически прозрачными пленками (например, Bio-Rad, США).
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР – «Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
  4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
  5. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
  6. Одноразовые наконечники для дозаторов до 200 мкл (например, Ахуген, США).
  7. Одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, Ахуген, США).
  8. Штативы для наконечников (например, Ахуген, США) и микропробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
  9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
  10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
  11. Емкость для сброса наконечников.

## **ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Для проведения анализа используются образцы ДНК (полученные после этапа выделения ДНК), содержащие последовательность промотора 35S и ДНК сои (см. инструкцию по применению набора реагентов «АмплиСенс<sup>®</sup> ГМ соя-линии-FL»).

Образцы ДНК, предназначенные для исследования, должны храниться при температуре от 2 до 8 °С не более 1 нед и при температуре не выше минус 16 °С – не более 1 года.

## ФОРМАТ FRT СОСТАВ

**«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F** – комплект реагентов для ПЦР-амплификации и идентификации ДНК генетически модифицированной сои линий 40-3-2, A5547-127, A2704-12 с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>ПЦР-смесь-1-FRT ГМ соя-линии</b>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,11	6 пробирок
<b>ПЦР-буфер-Flu</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,35	1 пробирка
<b>Полимераза (TaqF)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,035	1 пробирка
<b>ПКО ДНК ГМ соя-линии</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
<b>TE-буфер</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций, включая контрольные образцы.

### ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Проведение амплификации с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

### ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

**Общий объем реакции - 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.**

#### **А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.**

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT ГМ соя-линии** (1 пробирка рассчитана на постановку 10 реакций). Перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **10\*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FRT ГМ соя-линии**, **5\*(N+1) мкл ПЦР-буфера-Flu** и **0,5\*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**.
3. Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по **15 мкл** в микропробирки

на 0,2 мл.

- Используя наконечник с аэрозольным барьером в подготовленные пробирки добавить по **10 мкл ДНК** исследуемых образцов. (**Необходимо избегать попадания сорбента универсального в реакционную смесь**).
- Поставить **контрольные реакции амплификации**:
  - отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК пробы внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**
  - положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК ГМ соя-линии**.

## **Б. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)**

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

### Программирование амплификатора:

**Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q 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 / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.**

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
- В открывшемся окне выбрать меню **Advanced/Детальный мастер** и шаблон запуска эксперимента **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора **36-Well Rotor/36-луночный ротор**. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction**



**volume/Объем реакции – 25 мкл.** Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска.** (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить её с помощью мышки).

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

Этап	Температура, °С	Продолжительность Этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	10 с	–	10
	61	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling2/Циклирование2	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 с	–	

9. Нажать кнопку **OK/Да.**
10. В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне **Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала** нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Демек-мых,** пометить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге демекции.** Для всех красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение **5,** а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение **10.** В графе **Tube position/Позиция Пробирки** указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр **gain/усиление сигнала,** по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Закрыть окно **Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала,** нажав кнопку **Close/Заккрыть.**
11. Нажать кнопку **Next/Далее,** запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт.**

12. Дать название эксперимента 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 ГМ сои линии A5547-127:

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
3. 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**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть нажаты кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
5. В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 20 %**.
6. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

#### Анализ результатов амплификации ДНК ГМ сои линии 40-3-2:

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
3. 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** будет видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).

4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть нажаты кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
5. В меню основного 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 **Threshold/Порог** = 0.05.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

#### Анализ результатов амплификации ДНК ГМ сои линии A2704-12:

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
3. 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** будет видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть нажаты кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
5. В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)** – 15 %.
6. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог** = 0.1.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

## **В. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора iQ iCycler и iQ5 (Bio-Rad, 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/iQ5.
3. Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE** и **ROX**.
  - Для прибора **iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Редактируйте схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. Задайте объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохраните 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 каналам **FAM, JOE** и **ROX**. 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 для амплификатора iQ iCycler/iQ5

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Cycle 1	95	15 мин	–	1
Cycle 2	95	10 с	–	10
	61	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycle 3	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM, JOE, ROX	
	72	10 с	–	

- Для прибора **iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажмите кнопку **Create New** или **Edit**. Задайте параметры амплификации и сохраните протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках 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** (GMO.tmo) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках 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 **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 **iQ iCycler** 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 ГМ сои линии A5547-127:

- Для прибора **iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **FAM-490**. 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**. 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**.

#### Анализ результатов амплификации ДНК ГМ сои линии 40-3-2:

- Для прибора **iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**, отключив кнопку **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- 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**. 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**.

#### Анализ результатов амплификации ДНК ГМ сои линии A2704-12:

- Для прибора **iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **ROX**, отключив кнопку **JOE**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iQ iCycler** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **ROX-575**. 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**. 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*.

## Г. Порядок проведения реакции амплификации, анализа и учета результатов при помощи прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия)

**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, «ГМ-идентификация» – 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.
  - Флуорофоры – Fam - специфика; Hex- специфика; Rox – специфика.
  - Задать программу амплификации (см. ниже) и нажать **ОК**.

### Программа амплификации

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	10 с	–	10
	61	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling2/Циклирование2	95	10 с	–	35
	54	25 с	Fam, Hex, Rox	
	72	10 с	–	

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «ГМ-идентификация», указать количество образцов и нажать **ОК**.



5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.
6. 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.
7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов амплификации участка ДНК, специфичного для линий сои A5547-127, 40-3-2 и A2704-12 (каналы Fam, Hex и Rox соответственно).

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: St(Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (St)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить критерии положительных результатов по нижней и верхней границам 30 %. Опцию **Нормализация данных** не использовать (галочка напротив соответствующей графы должна отсутствовать).
5. Отключить фитирование (сглаживание) кривых.
6. 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 ПКО.

#### **Д. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора «АНК-16»/«АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия)**

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:

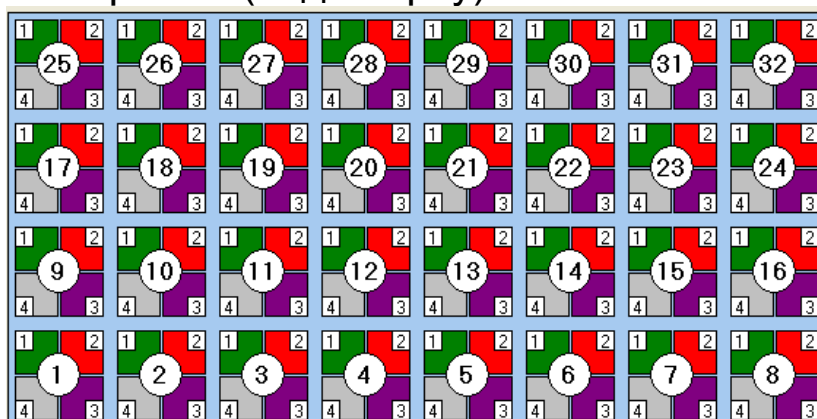
Номер ступени	Температура (градусы)	Время (секунды)	Количество циклов
1	95 °С	900	1
2	95 °С	10	10
3	61 °С	20	10
4	72 °С	10	10
5	95 °С	10	35
6	54 °С	20	35
7	72 °С	10	35

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 параметров циклирования в том же окне нажать кнопку **Установить параметры циклов**. В появившемся окне для первого блока циклирования установить следующие значения: **Начало** – шаг 2, **Конец** – шаг 4, **Количество циклов** – 10 и нажать кнопку **Применить**, затем установить значения для второго блока циклирования: **Начало** – шаг 5, **Конец** – шаг 7, **Количество циклов** – 35 и нажать кнопку **Применить**.
4. В том же окне (**Циклический**) нажать кнопку **Красители** и в появившемся списке отметить используемые каналы детекции: FAM, R6G, ROX, затем нажать **ОК**.
5. 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, «Идентификация ГМО» – и нажать **ОК**.

#### Запуск амплификации.

1. Для запуска ранее созданной программы в окне **Циклический** выбрать **Загрузить**, далее соответствующего пользователя в левой части окна и название программы (метода) в правой, далее нажать **Загрузить**.
2. 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. Необходимо задать названия образцов для каждого используемого канала в отдельности, переключая вкладки каналов слева вверху окна. Доступна функция копирования и вставки списка образцов, заданного для одного канала на другие каналы (список копируется целиком, выделение не предусмотрено). После заполнения таблицы нажать **ОК**.
3. Открыть крышку прибора и установить пробирки со сферическими крышками в соответствующие ячейки, закрыть и завинтить крышку. Ячейки нумеруются следующим образом (вид сверху):



4. Проверить правильность заданной программы и нажать **Старт** для запуска теста.

5. При появлении окна **Проверка времени измерения**, выбрать 2, нажать **ОК**. После этого программа амплификации начнёт выполняться.
6. После завершения амплификации перейти к анализу результатов.

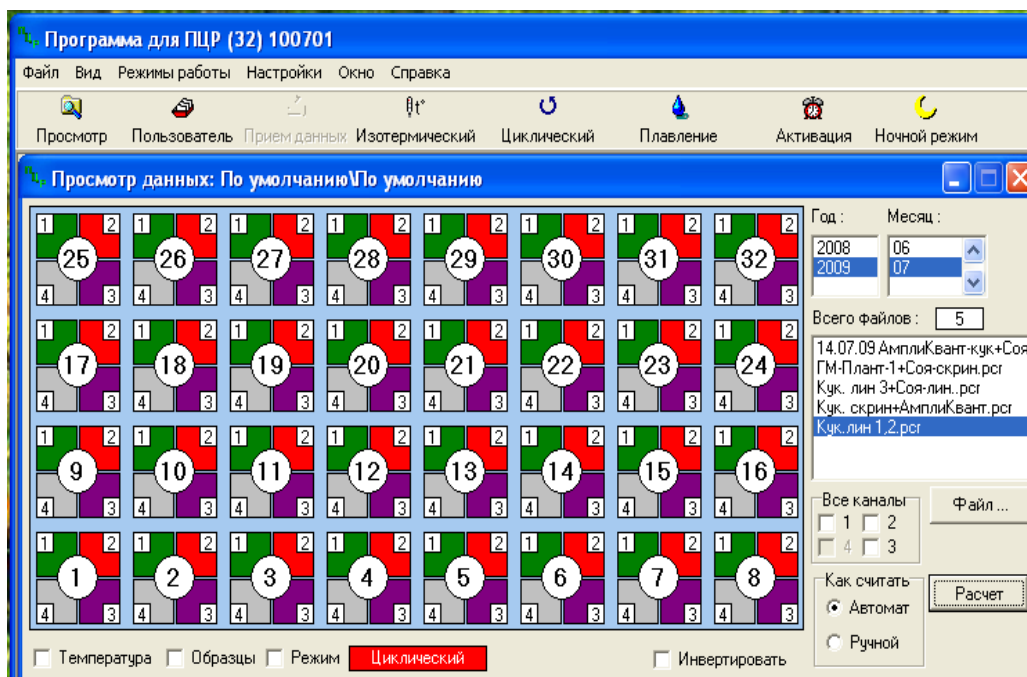
Анализ результатов амплификации участка ДНК, специфичного для линий сои A5547-127, 40-3-2 и A2704-12 (каналы FAM, R6G и ROX соответственно).

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

	Канал 1	Канал 2	Канал 3	Канал 4
Отношение максимум/минимум больше, чем :	1.200	1.200	1.200	1.200
Отношение между соседними точками меньше	2.100	2.100	2.100	2.100
Абсолютный рост по амплитуде больше, чем :	50	50	50	50
Порог :	0.000			
Расчет по последним точкам				
Отношение максимум/минимум больше, чем	1.100	1.100	1.100	1.100
Уровень порогового цикла:	0.000			
	<input type="checkbox"/> Включить в расчет			
Число точек на полке:	3			

После установки параметров нажать **ОК**. Данные установки сохранятся при следующем запуске программы «ПЦР».

2. 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 \*.psr. 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 5 (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 всем использованным каналам 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.
5. Образцы, для которых получены значения  $C_t$  (значения указаны в графе **Цикл** окна результатов) являются положительными. Образцы, для которых  $C_t$  рассчитать не удалось (вместо значений  $C_t$  в графе **Цикл** стоит  $\geq 35$ ) считаются отрицательными.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на рекомендуемом уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения

порогового цикла «*Ct*» в таблице результатов).

1. Учет результатов анализа следует начинать с результатов амплификации ДНК контрольных образцов. Для положительного контроля амплификации в таблицах результатов по каналам FAM (Green), JOE (Yellow) и ROX (Orange) должны присутствовать значения порогового цикла *Ct*. Для отрицательного контрольного образца и отрицательного контроля амплификации значения порогового цикла *Ct* по всем каналам должны отсутствовать.
2. В образце обнаружена ДНК ГМ сои линии A5547-127, если в таблице результатов по каналу FAM (Green) для него определено значение порогового цикла *Ct*.
3. В образце обнаружена ДНК ГМ сои линии 40-3-2, если в таблице результатов по каналу JOE (Yellow) для него определено значение порогового цикла *Ct*.
4. В образце обнаружена ДНК ГМ сои линии A2704-12, если в таблице результатов по каналу ROX (Orange) для него определено значение порогового цикла *Ct*.

#### **Возможные ошибки:**

1. Появление любого значения *Ct* в таблице результатов для отрицательного контроля ПЦР (**ТЕ-буфер**) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных образцов считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных по данному каналу детекции проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

**Срок годности.** 15 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

**Транспортирование.** Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 сут.

**Хранение.** Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме полимеразы (TaqF) и ПЦР-смеси-1-FRT ГМ соя-линии. Полимеразу (TaqF) и ПЦР-смесь-1-FRT ГМ соя-линии хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Следует избегать длительного нахождения ПЦР-смеси-1-FRT ГМ соя-линии на свету.

## **ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ**

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru)<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

**REF**

Номер в каталоге



Осторожно!  
Обратитесь к  
сопроводительной  
документации

**LOT**

Код партии



Максимальное  
число тестов

**RUO**

Только для  
исследовательских и  
иных немедицинских  
целей



Использовать до

**VER**

Дата изменения



Обратитесь к  
руководству по  
эксплуатации



Ограничение  
температуры



Не допускать  
попадания  
солнечного света



Производитель



Дата изготовления



**Лист вносимых изменений**

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
03.09.07	п. Программирование амплификатора	Дополнен п.9
	п. Анализ результатов амплификации ДНК ГМ сои линии A2704-12	Добавлена фраза: В меню основного окна (Quantitation analysis) должна быть нажата кнопка <b>«Slope Correct»</b> .
		Добавлен пункт: В меню основного окна <b>«More settings» («Outlier Removal»</b> для «Rotor-Gene» 6000) установить значение NTC threshold 10%.
12.10.07	п. Анализ результатов амплификации ДНК ГМ сои линии A5547-127 и п. Анализ результатов амплификации ДНК ГМ сои линии 40-3-2	Добавлена фраза: В меню основного окна (Quantitation analysis) должна быть нажата кнопка <b>«Slope Correct»</b> .
21.12.07	Программирование амплификатора	Добавлено программное обеспечение для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000
	Анализ результатов амплификации ДНК ГМ сои линии A2704-12	Изменено значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 15%
03.10.08	По всему тексту	Уточнено название и назначение набора реагентов. Добавлена форма комплектации
		Комплект реагентов «АмплиСенс» заменен на «ПЦР-комплект»
	п. Дополнительные материалы и оборудование	Добавлены пункты: Взятие исследуемого материала. Транспортирование и хранение проб и Меры предосторожности
13.04.09	По всему тексту	Уточнено название оборудования и названия фирм-производителей
26.08.09	Нижний колонтитул	Добавлены приборы «iQ iCycler»/«iQ5»
15.12.09	п. Проведение ПЦР-амплификации	Указано соответствие каталожного номера и формы комплектации
	Возможные ошибки	Добавлено проведение амплификации на приборах ДТ-96 и АНК-32
11.05.10	-	Уточнения по тексту
29.09.10	По тексту	Добавлена фраза про анкету потребителя
		Добавлен прибор Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)
	Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).	Удалены кавычки из названий иностранных приборов. В п.6 анализа результатов фраза «В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога» изменена на «В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне 5-10% от максимального значения флуоресцентного сигнала ПКО».

	Возможные ошибки	В п. 1 фраза «В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации» изменена на «В этом случае результаты анализа положительных образцов считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных по данному каналу детекции проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации».
25.07.11 RT	По тексту	Добавлен раздел «Символы, используемые в печатной продукции»
		Изменено название института на ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
		«Вариант FRT» исправлен на «формат FRT»
		Исправления по шаблону
	Форматы и формы выпуска набора реагентов	Добавлена форма 2 – комплектация наборов оптом
	Меры предосторожности	СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» заменен на СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Добавлена фраза о хранении вскрытых реагентов
Добавлена ссылка об отзывах и предложениях		
Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»	
Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы	
12.08.11 RT	Меры предосторожности	МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности» заменены на МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
27.09.11 VV	Титульная страница	Добавлены символ, наименование и адрес производителя
		Значок «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» перемещен в правый нижний угол страницы
		Удалена информация из нижнего колонтитула
03.09.12 IvI	Титульная страница	Замена символа «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» на символ «Только для исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	

	Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия)	Изменено написание каналов для прибора «ДТ-96»
28.01.15 PM	Титульный лист	Для символа <b>RUO</b> добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	Для символа <b>RUO</b> изменена фраза с «Только для исследовательских целей» на «Только для научно-исследовательских целей»
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен адресат для направления рекламаций
03.02.15 ChA	Титульный лист	Для символа <b>RUO</b> изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
12.09.16 ME	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Указан срок годности набора реагентов – 9 мес.
31.08.17 MM	Нижний колонтитул	Добавлен каталожный номер <b>REF</b> G-2421-1
20.06.18 TA	Формат FRT Состав	Уточнен цвет ПЦР-смеси-1-FRT ГМ соя-линии, внесены правки по шаблону
15.03.19 PM	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Срок годности изменен на 15 месяцев
27.01.20 VA	Гарантийные обязательства изготовителя	Раздел добавлен
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалена фраза о разуконплектации набора реагентов
30.04.20 VA	Титульный лист	Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Назначение	Добавлена фраза «не является медицинским изделием»
08.10.20 MA	Аналитические характеристики Аналитическая чувствительность	Комплект для экстракции «ДНК-сорб-С» заменен на «ДНК-сорб-С-М»