

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК вируса мозаики цветной капусты
(*CamV*), инфицирующего растения семейства *Brassicaceae*
(Капустные), в продуктах питания и кормах для животных
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *CamV-FL*»

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	7
ФОРМАТ FRT	9
СОСТАВ.....	9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	9
А. ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ	9
Б. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА ROTOR-GENE 3000/6000 (CORBETT RESEARCH, АВСТРАЛИЯ), ROTOR-GENE Q (QIAGEN, ГЕРМАНИЯ).	10
В. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА ICYCLER IQ/IQ5 (BIO-RAD, США).....	13
Г. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», РОССИЯ).	16
Д. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА «АНК-16»/«АНК-32» (ЗАО «СИНТОЛ», РОССИЯ).	18
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	22
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25

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[®] CamV-FL» не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для выявления ДНК вируса мозаики цветной капусты (*Cauliflower mosaic virus - CamV*), инфицирующего растения семейства *Brassicaceae* (Капустные), в продуктах питания и кормах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Данный набор реагентов следует использовать после этапов скрининга и идентификации при проведении мониторинга генетически-модифицированных ингредиентов растительного происхождения в продуктах питания и кормах. Использование данного теста позволяет получить информацию о происхождении ДНК 35S-промотора, присутствующего в образце, который может быть как вирусным, так и трансгенным. Для этого проводится амплификация ДНК-мишени, специфичной для вируса мозаики цветной капусты (*CamV*), совместно с амплификацией эндогенного контроля (ЭК) - гена, специфичного для растительных тканей.

Целесообразно использовать данный набор реагентов для тестирования образцов, обладающих всеми нижеперечисленными характеристиками:

- а) образцы, которые могут потенциально содержать ткани культурных растений семейства *Brassicaceae*: капуста, хрен, редька, редис, горчица, кресс-салат, рапс, брюква, репа, турнепс и др.;
- б) образцы, в которых на этапе скрининга обнаружена последовательность промотора 35S (или региона энхансера 35S) вируса мозаики цветной капусты, причём другие трансгенные мишени (терминатор NOS и т.д.) не

обнаружены;

в) образцы, для которых на этапе идентификации не выявлено присутствия зарегистрированных линий трансгенных растений.

Получение положительного сигнала по ДНК-мишени, специфичной для *CamV*, свидетельствует о наличии в составе тестируемого образца растительного компонента, инфицированного вирусом мозаики цветной капусты. При получении такого результата исследователь не имеет достаточных оснований считать, что данный образец содержит трансгенные компоненты растительного происхождения.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования: проведение полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов ПЦР в режиме «реального времени».

Анализ представляет собой проведение двух ПЦР (в одной пробирке), для каждой из которых используются специфичные праймеры и меченый флуоресцентными красителями зонд. В одной реакции выявляется последовательность ДНК-мишени, специфичной для вируса мозаики цветной капусты (*CamV*), которая не входит в рекомбинантные конструкции, используемые при создании трансгенных растений. Другая предназначена для амплификации эндогенного контроля (ЭК), в качестве которого использован ген, специфичный для растительного генома (как трансгенного, так и нетрансгенного), что позволяет определять присутствие ДНК растений в исследуемом образце и контролировать качество постановки ПЦР.

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 комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК вируса мозаики цветной капусты.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их

оптовой фасовке.

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.

ВНИМАНИЕ! Набор реагентов предназначен для работы с ранее экстрагированной ДНК, полученной с помощью наборов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора на этапах скрининга и идентификации.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид исследуемого материала	Комплект для выделения ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
Рекомендованный для данного набора	«ДНК-сорб-С-М»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	CamV – 10 копий ДНК/ПЦР
			ЭК – 10 копий ДНК/ПЦР

Аналитическая специфичность

Отсутствует положительная реакция при исследовании ДНК рекомбинантных конструкций, используемых для создания трансгенных растений.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, 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».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- 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

1. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) (4 канала детекции и более); Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия); iCycler iQ, IQ5 (Bio-Rad, США); «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), «АНК-16»/«АНК-32» («ЗАО Синтол», Россия) или эквивалентный.

Для прибора Rotor-Gene: одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР на 0,1 мл и 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, Ахуген, США).

Для приборов iCycler iQ, «ДТ-96» и «АНК-16» / «АНК-32»: одноразовые полипропиленовые пробирки 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).

2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР – «Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов до 200 мкл (например, Ахуген, США).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов с фильтром до 200 мкл (например, Ахуген, США).
7. Штативы для наконечников (например, Ахуген, США) и пробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

При проведении отбора проб пищевой продукции необходимо ознакомиться с МУ 2.3.2.1917-04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной

из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически-модифицированные аналоги».

Для проведения анализа используются образцы ДНК, полученные после этапа выделения ДНК из продуктов питания и кормов, в состав которых потенциально могут входить растения семейства Капустных (например, капуста, хрен, редька, редис, горчица, кресс-салат, рапс, брюква, репа, турнепс). Рекомендуется тестировать образцы ДНК, предварительно прошедшие этап скрининга, в результате которого показано наличие в них последовательности маркера трансгенной ДНК – промотора (или энхансера) 35S, и отсутствие других трансгенных маркеров, далее прошедшие через этап идентификации, в результате которой в них показано отсутствие ДНК зарегистрированных трансгенных линий.

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

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации и идентификации ДНК, специфичной для вируса мозаики цветной капусты (*CamV*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>CamV</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,11	6 пробирок
ПЦР-буфер-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,35	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,035	1 пробирка
ПКО <i>CamV</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

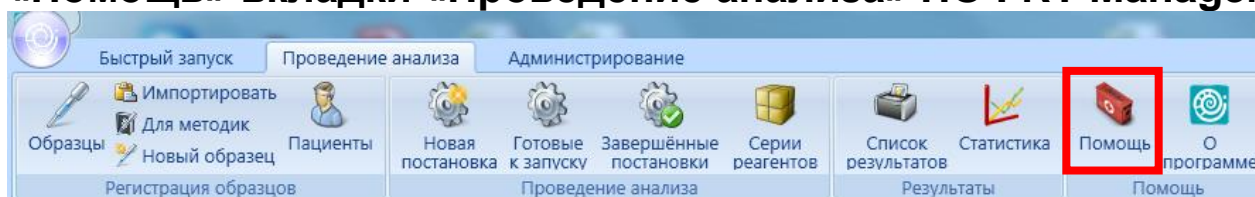
Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакции – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT *CamV*** (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 CamV**, 5*(N+1) мкл **ПЦР-буфера-Flu** и 0,5*(N+1) мкл **полимеразы (TaqF)**.
 3. Перемешать подготовленную смесь, осадить кратковременным центрифугированием и внести в каждую пробирку по **15 мкл** в пробирки на 0,2 мл.
 4. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК** исследуемых образцов. **(Необходимо избегать попадания сорбента универсального в реакционную смесь)**. Каждый исследуемый образец тестируется в двух повторах.
 5. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО CamV**.

Б. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).
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. Поместить пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene (ячейки карусели пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).
2. Запрограммировать прибор.

Программирование амплификатора:

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

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. Выбрать объем реакционной смеси и тип карусели:
Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл
36-Well Rotor/36-луночный ротор
3. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
5. Задать следующие параметры эксперимента:

Этап	Температура, °C	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, ROX/Orange	

6. Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
7. 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 всех красителей установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть - нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. 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 CamV (канал ROX/Orange):

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. 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 CT** (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = **0.05**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ЭК (эндогенного контроля) - ДНК растений (канал JOE/Yellow):

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку

- Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать.**
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
 - В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич. фон**.
 - 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**).
 - В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – **20%**.
 - В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = **0.1**.
 - В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

В. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора iCycler iQ/iQ5 (Bio-Rad, США).

- Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
- Открыть программу iCycler.
- Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам JOE, 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 JOE, 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 «GMO» для амплификатора iCycler iQ/iQ5

Этап	Температура, °С	Продолжительность Этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	15 с	–	42
	59	60 с	JOE, ROX	

- 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 **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 *CamV*.

1. Для прибора **iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу ROX. 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**.
2. Для прибора **iCycler iQ** 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*.

Анализ результатов амплификации ЭК (эндогенного контроля) - ДНК растений.

1. Для прибора **iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу JOE, отключив кнопку ROX. 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**.
2. Для прибора **iCycler iQ** 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*.

Г. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании 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, «СамV» - 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 – HEX - ВК; 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	–	40
	59	60 с	HEX, ROX	

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «CamV», 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 ДНК CamV и ДНК растений (каналы ROX и HEX соответственно).

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. Отключить фитирование (сглаживание) кривых.
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).

- 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.

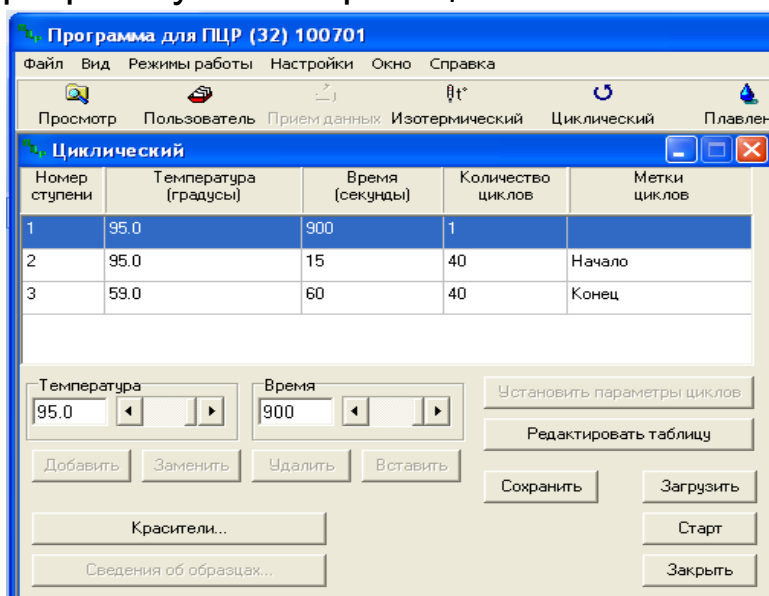
Д. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора «АНК-16»/«АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия).

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

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



- 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**.

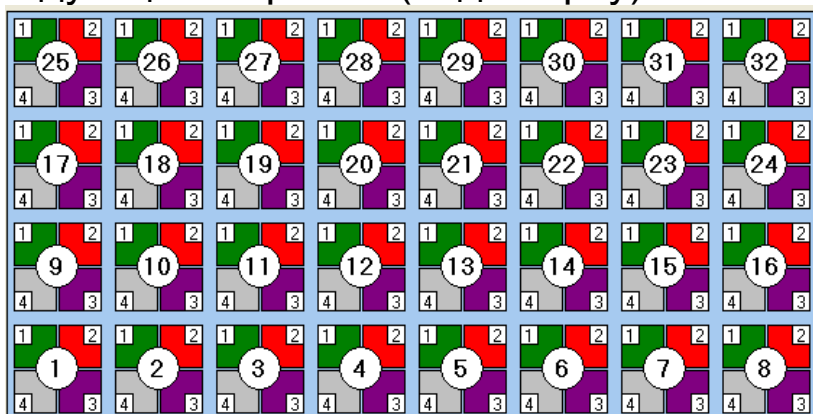
3. Для установки количества циклов в окне **Циклический** нажать кнопку **Установить параметры циклов**. В появившемся окне установить следующие значения **Начало** – шаг 2, **Конец** – шаг 3, **Количество циклов** – 40 и нажать кнопку **Применить**.
4. В том же окне (**Циклический**) нажать кнопку **Красители** и в появившемся списке отметить используемые каналы детекции: R6G и 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, «SamV» – 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 **OK**.

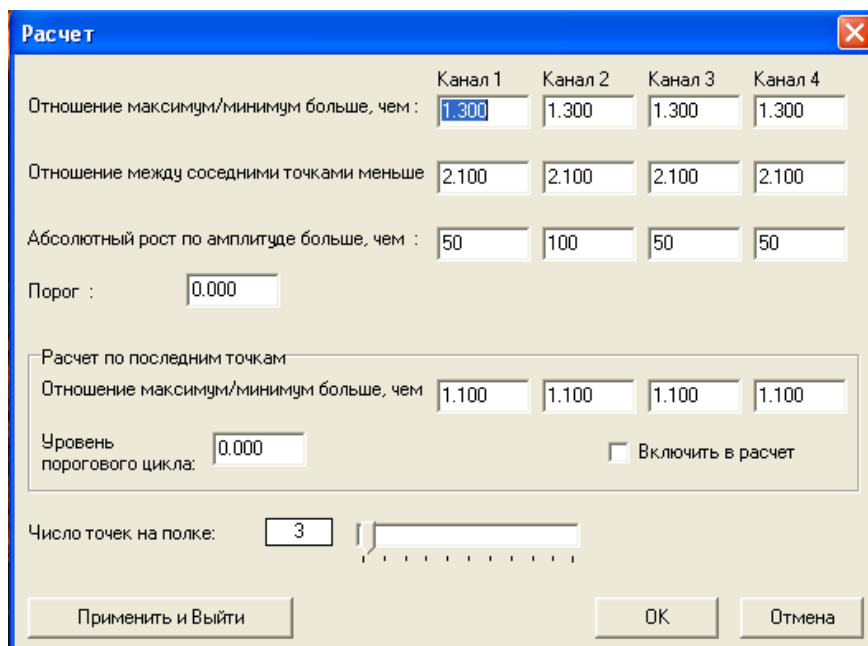
- Открыть крышку прибора и установить пробирки со сферическими крышками в соответствующие ячейки, закрыть и завинтить крышку. Ячейки нумеруются следующим образом (вид сверху):



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

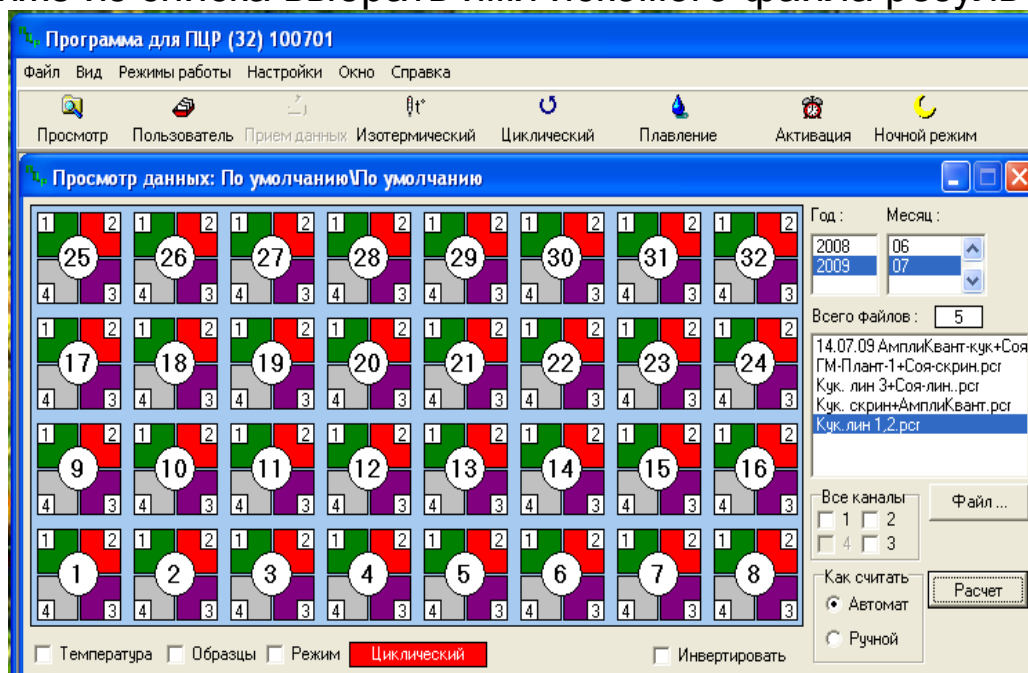
Анализ результатов амплификации ДНК *CamV* и ЭК (эндогенного контроля) ДНК растений (каналы ROX и R6G соответственно).

- 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**, пронумерованные 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.



- В окне **Просмотр данных** отметить галочкой пункт **Режим**.

В появившемся окне в пункте **Номер ступени для расчета** выставить значение 3 (если выставлено другое значение).
Закрывать 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 *St* (значения указаны в графе **Цикл** окна результатов) являются положительными. Образцы, для которых *St* рассчитать не удалось (вместо значений *St* в графе **Цикл** стоит «≥40») считаются отрицательными.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *St* в соответствующей графе в таблице результатов).

1. Учет результатов анализа следует начинать с результатов амплификации ДНК контрольных образцов. Для положительного контроля амплификации в таблицах результатов по каналам **JOE/Yellow/HEX/R6G** и **ROX/Orange** должны присутствовать значения порогового цикла *St*. Для отрицательного контрольного образца и отрицательного контроля амплификации значения порогового цикла *St* по всем каналам должны отсутствовать.
2. В образце обнаружена ДНК *CamV*, если в таблице результатов по каналу **ROX/Orange** для него определено значение порогового цикла *St*.

Возможные ошибки:

1. Отсутствие в исследуемом образце положительного сигнала

по каналу **JOE/Yellow/HEX/R6G** требуется повторное исследование данного образца, начиная с этапа ПЦР. При повторном получении аналогичного результата следует повторно провести экстракцию ДНК и ПЦР.

2. Появление любого значения **Ct** в таблице результатов для отрицательного контроля ПЦР (**TE-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.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор 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 не более 5 сут.

Хранение. Набор реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-1-FRT *CamV* и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-1-FRT *CamV* и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *CamV* хранить в защищенном от света месте.

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)¹.

¹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Только для
исследовательских и
иных немедицинских
целей



Использовать до



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
22.07.11 VV	Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»
	Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы
	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»
	По тексту	Добавлен раздел «Символы, используемые в печатной продукции»
		Изменено название института на ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Вариант FRT» исправлен на «формат FRT»
	Форматы и формы выпуска набора реагентов	Добавлена форма комплектации 2 – комплектация наборов оптом
Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Добавлена фраза о хранении вскрытых реагентов	
30.09.11 LA	Титульная страница	Добавлены символ, наименование и адрес производителя
		Символ «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» перемещен в правый нижний угол страницы
		Удалена информация из нижнего колонтитула
27.04.12 IV	Титульная страница	Замена значка «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» на значок «Только для исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
27.01.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	Для символа RUO изменена фраза с «Только для исследовательских целей» на «Только для научно-исследовательских целей»
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен адресат для направления рекламаций
02.02.15 BO	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
27.12.17 DV	Нижний колонтитул	Добавлен каталожный номер для Формы 1 REF G-2951-1
21.03.18 TA	Б.Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).	Добавлена информация про FRT manager

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
06.02.19 PM	По тексту	Изменено форматирование текста инструкции
27.01.20 VA	Гарантийные обязательства изготовителя	Раздел добавлен
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалена фраза о разуконплектации набора реагентов
21.04.20 MM	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»