

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для количественного определения ДНК генетически
модифицированной кукурузы в продуктах питания и кормах для
животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиКвант ГМ кукуруза-NOS-FL»

Формат FRT

АмплиСенс®



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



Только для исследовательских и
иных немедицинских целей

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).....	6
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США).....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).....	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ «АНК-16» и «АНК-32» («Синтол», Россия)	19

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК генетически модифицированной кукурузы в продуктах питания и кормах для животных методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» «АмплиКвант ГМ кукуруза-NOS-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия),
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США),
- «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия),
- «АНК-16», «АНК-32» («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
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! В соответствии с Директивой Европейского Союза 1999/45/ЕС и Регламентом (ЕС) 1272/2008 следующие реагенты подлежат маркировке как содержащие опасные вещества:

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

Наименование реагента	Символы и обозначения опасности согласно Директиве 1999/45/ЕС	Факторы риска и безопасности реагента (R- и S-фразы)	Символы опасности, сигнальное слово согласно Регламенту (ЕС) 1272/2008	Заявление об опасности, дополнительная информация	Меры предосторожности				Наименование опасного вещества в составе реагента	Символы опасности и сигнальное слово вещества согласно Регламенту (ЕС) 1272/2008	Заявление об опасности, дополнительная информация, факторы риска (R фразы)	по ГН 2.2.5.1313-03 ²			
					Предупреждение	Реакция	Хранение	Утилизация				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м ³	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Буфер для лизирующего реагента (входит в «ДНК-сорб-С»)		R22, R36/38, S22		H302, H315, H319	P264, P270, P280	-	P501	Гуанидин хлорид		H302, H315, H319, R22, R36/38	Нет данных				
								Тритон X-100	 	H302, H319, H411, R22, R41, R51/53	Нет данных				
Раствор для отмывки 1 (входит в «ДНК-сорб-С»)		R20/21/22, R32, R34, R52/53, S13, S26, S36/37/39, S45, S61		H302, H312, H332, H412, EUH032	P260, P264, P270, P271, P273, P280	-	P501	Гуанидин тиоцианат		H302, H312, H332, H412, EUH032, R20/21/22, R32, R34, R52/53	Нет данных				
								Тритон X-100	 	H302, H319, H411, R22, R41, R51/53	Нет данных				
Раствор для отмывки 2 (входит в «ДНК-сорб-С»)	 	R10, R36, R67, S7, S16, S24/25, S26	 	H319, H226, H336	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P264, P271, P280	P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P337+P313, P312, P370+P378	P403+P233, P403+P235, P405	P501	Изо-пропанол	  	H225, H319, H336, R11, R36, R67	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

Расшифровка обозначений:

F: Легковоспламеняющийся

Xn: Вредный для здоровья

Xi: Вызывающий раздражение.

Dgr: Опасно.

Wng: Предупреждение.

H225:Высокогорючая жидкость и пар.

H226: Горючая жидкость и пар.

H302: Вредно при проглатывании.

H312: Вредно при контакте с кожей.

H315: Вызывает раздражение кожи.

H319: Вызывает серьезное раздражение глаз.

H332: Вредно при вдыхании.

H336: Может вызвать вялость или сонливость.

H411: Токсичен для водных организмов с долгосрочными последствиями.

H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.

R10: Огнеопасно.

R11: Очень огнеопасно.

R20/21/22: Опасно при вдыхании, попадании на кожу и проглатывании.

² Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. «Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

R22: Опасно при проглатывании.
R32: При контакте с кислотами выделяет очень токсичный газ.
R34: Вызывает ожоги.
R36: Вызывает раздражение глаз.
R36/38: Раздражает глаза и кожу.
R41: Риск серьезного повреждения глаз.
R51/53: Токсично для водных организмов, может вызывать продолжительные неблагоприятные изменения в водной среде.
R52/53: Опасно для водных организмов, может вызывать продолжительные неблагоприятные изменения в водной среде.
R67: Пары могут вызвать сонливость и головокружение.
S7: Хранить плотно закрытым.
S13: Хранить вдали от продуктов питания, напитков и корма для животных.
S16: Хранить вдали от источников воспламенения. Не курить.
S22: Не вдыхать пыль.
S24/25: Избегать попадания на кожу и в глаза.
S26: В случае попадания в глаза немедленно промыть глаза большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью.
S36/37/39: Надеть соответствующую защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз/лица.
S45: В случае аварии или при плохом самочувствии немедленно обратиться за медицинской помощью (по возможности предъявить этикетку материала).
S61: Не допускать попадания в окружающую среду. Смотрите специальные инструкции/паспорт безопасности материала.
P210: Хранить вдали от источников тепла, горячих поверхностей, искр, открытого пламени и других источников воспламенения. Не курить.
P233: Хранить в плотно закрытой таре.
P240: Заземлить / соединить контейнер и приемное оборудование.
P241: Использовать взрывобезопасное электрическое оборудование.
P242: Используйте только неискрящие инструменты.
P243: Принять меры предосторожности против статического разряда.
P260: Не вдыхать пары.
P261: Избегать вдыхания паров.
P264: Вымойте руки после работы тщательно.
P270: Не ешьте, не пейте и не курите в процессе использования этого продукта.
P271: Используйте только на открытом воздухе или в хорошо проветриваемом помещении.
P273: Избегать попадания в окружающую среду.
P280: Пользоваться защитными перчатками/ средствами защиты глаз.
P301 + 312: При проглатывании: обратиться к врачу при плохом самочувствии.
P303 + P361 + P353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой.
P304 + P340: При вдыхании: Вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить удобство дыхания.
P305 + 351 + 338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз, снять их и продолжить промывание водой.
P312: Обратиться к врачу при плохом самочувствии.
P321: Специальные меры (см. острая токсичность при попадании на кожу в этом документе).
P322 Специальные меры.
P330: Прополоскать рот.
P332 + 313: В случае раздражения кожи: Обратиться за советом врача.
P337 + 313: Если раздражение глаз не проходит обратиться за медицинской консультацией.
P362: Немедленно снять зараженную одежду.
P363: Постирать загрязненную одежду перед последующим использованием.
P370 + P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения.
P403 + P233: Хранить в хорошо проветриваемом месте. Держать контейнер плотно закрытым.
P403 + P235: Хранить в хорошо проветриваемом месте. Хранить в прохладном месте.
P405: Хранить под замком.
P501: Утилизировать содержимое в соответствии с национальными правилами САНПИН 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".
EUN032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.

ВНИМАНИЕ! При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91.

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

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/Q / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

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).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор.
2. Установить пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene 3000/6000 (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 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**.
5. 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**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
6. В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
7. Задать следующие параметры эксперимента:

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	40
	59	60 с	ROX/Orange, JOE/Yellow	

8. Нажать дважды кнопку **ОК/Да**.
9. В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт. уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт.детек-мых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для используемых каналов ROX/Orange и JOE/Yellow установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5FI** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10FI**. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
10. Запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
11. 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 роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы, калибровочные стандарты и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

Анализ результатов

Анализ результатов амплификации терминатора NOS (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 меню ***Eliminate cycles before:/Исключить циклы до:*** (в правой части окна) выставить ***10***.
8. В таблице результатов (окно ***Quant. Results/Количественные Результаты***) появятся значения ***Ct***.

Анализ результатов амплификации ЭК кукуруза (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***.
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 меню ***Eliminate cycles before:/Исключить циклы до:*** (в правой части окна) выставить ***10***.
8. В таблице результатов (окно ***Quant. Results/Количественные Результаты***) появятся значения ***Ct***.

Расчет количественного содержания генетически модифицированной кукурузы в анализируемых образцах.

Проводится в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS) на базе Excel.

1. Открыть программу «ГМИ-квант (вариант NOS)_шаблон». Не отключать макросы.
2. Сохранить файл с расширением ***Книга Microsoft Excel***, указав дату анализа.
3. Перейти на лист ***Экспорт***.
4. В окне ***Quant. results – Cycling A.ROX (Cycling A. Orange)*** программы ***Rotor-Gene***

скопировать столбец **Name** и перенести на лист **Экспорт** программы «ГМИ-квант» (вариант NOS) в столбец **Name** поля **ROX**.

5. В окне **Quant. results– Cycling A.ROX (Cycling A. Orange)** программы **Rotor-Gene** скопировать столбец **Ct** и перенести на лист **Экспорт** программы «ГМИ-квант» (вариант NOS) в столбец **Ct** поля **ROX**.
6. Прodelать аналогичные манипуляции для **ЭК кукуруза**, скопировав данные из окна **Quant. results – Cycling A.JOE (Cycling A. Yellow)** программы **Rotor-Gene** в столбцы поля **JOE**.
7. В программе ГМИ-квант (вариант NOS) перейти на лист **Результаты**.
8. В таблицу 1 в верхнем левом углу вставить значения **среднее DCt** для каждого калибровочного стандарта, выбрав их из столбца **среднее ΔCt**.
9. После ввода последнего значения автоматически произойдет расчет содержания ГМ кукурузы в тестируемых образцах, и эти значения появятся в столбце **% ГМИ**.

Если результат больше, чем 5 % ГМ кукурузы, то он выдается как **содержание ГМ кукурузы более 5 %**. Если результат меньше, чем 0,1 % ГМ кукурузы, то он выдается как **содержание ГМ кукурузы менее 0,1 %**.

Учет результатов

При получении значения **Ct** в таблице результатов для **ЭК (канал JOE/Yellow)** для анализируемой пробы **более 34**, требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если:

1. Получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 1.
2. Коэффициент корреляции (R^2), полученный в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS), **более 0,97**.
3. Полученные расчетные значения для **ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 %** и **калибровочных стандартов** укладываются в следующие доверительные интервалы:
Кст 0,1 %: $0,1\% \pm 0,025$;
Кст 1 % и ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 %: $1\% \pm 0,25$;
Кст 5 %: $5\% \pm 1,25$.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу ROX/Orange	по каналу JOE/Yellow
В-	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	≤ 33	≤ 27

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции (В-) и для отрицательного контроля ПЦР (К-) на любом из каналов свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Коэффициент корреляции (R^2), полученный в программе ГМИ-квант (вариант NOS), **менее 0,97**. Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.
3. Полученные расчетные значения для ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 % и калибровочных стандартов **не укладываются** в указанные доверительные интервалы (см. выше). Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США)

При использовании прибора iCycler iQ или iQ5 рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, Axugen, США).

Программирование амплификатора

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 каналам **ROX** и **JOE**.
 - Для прибора **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 каналам **ROX-575** и **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 для амплификаторов iCycler iQ и iQ5

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	42
	59	60 с	ROX/ROX-575, JOE/HEX/JOE-530	

- Для прибора **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 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.
6. Запустить выполнение выбранной программы **GMO** с заданной схемой планшета.
 - 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**.
7. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

Анализ результатов амплификации терминатора NOS:

1. 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 **ROX**. 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.

2. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
3. 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 **Analyse Data**. 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**. 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**.

Анализ результатов амплификации ЭК кукуруза (эндогенного контроля)

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). 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 **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**.

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**.

Расчет количественного содержания генетически модифицированной кукурузы в анализируемых образцах.

Проводится в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS) на базе Excel.

1. Открыть программу «ГМИ-квант (вариант NOS)_шаблон». Не отключать макросы.
2. Сохранить файл с расширением **Книга Microsoft Excel**, указав дату анализа.
3. Перейти на лист **Экспорт**.
4. В окне **PCR Quantification** программы **iCycler** скопировать столбец **Identifier** (используя комбинацию клавиш **Ctrl+C**) и перенести на лист **Экспорт** программы «ГМИ-квант» (вариант NOS) в столбец **Name** поля **ROX**.
5. В окне **PCR Quantification** программы **iCycler** скопировать столбец **Ct** и перенести на лист **Экспорт** программы «ГМИ-квант» (вариант NOS) в столбец **Ct** поля **ROX**.
6. Прodelать аналогичные манипуляции для **ЭК кукуруза** в окне **PCR Quantification** программы **iCycler**, скопировав данные в столбцы поля **JOE**.
7. В программе «ГМИ-квант» (вариант NOS) перейти на лист **Результаты**.
8. В таблицу 1 в верхнем левом углу вставить значения **среднее DCt** для каждого калибровочного стандарта, выбрав их из столбца **среднее ΔCt**.
9. После ввода последнего значения автоматически произойдет расчет содержания ГМ кукурузы в тестируемых образцах, и эти значения появятся в столбце **% ГМИ**.
Если результат больше, чем 5 % ГМ кукурузы, то он выдается как **содержание ГМ кукурузы более 5 %**. Если результат меньше, чем 0,1 % ГМ кукурузы, то он выдается как **содержание ГМ кукурузы менее 0,1 %**.

Учет результатов

При получении значения **Ct** в таблице результатов для **ЭК (канал JOE)** для анализируемой пробы **более 35** требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если:

1. Получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 2.
2. Коэффициент корреляции (R^2), полученный в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS), **более 0,97**.
3. Полученные расчетные значения для **ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 %** и **калибровочных стандартов** укладываются в следующие доверительные интервалы:
 Кст 0,1 %: $0,1\% \pm 0,025$;
 Кст 1 % и ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 %: $1\% \pm 0,25$;
 Кст 5 %: $5\% \pm 1,25$.

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct	
		по каналу для флуорофора ROX	по каналу для флуорофора JOE
В–	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	$\leq 35^*$	$\leq 27^*$

*При установке пороговой линии на уровне не более 10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала К+.

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции (В–) и для отрицательного контроля ПЦР (К–) на любом из каналов свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Коэффициент корреляции (R^2), полученный в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS), **менее 0,97**. Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.
3. Полученные расчетные значения для ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 % и калибровочных стандартов **не укладываются** в указанные доверительные интервалы (см. выше). Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ 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, **Кукуруза-NOS-количество** – и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный (так как количественный расчёт производится в отдельной программе).
 - **Метод** – Пороговый (Ct).
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль –
 - **Контроли**: положительный (K+) – 1, отрицательный (K-) – 1.
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл.
 - **Флуорофоры** – Rox – специфика; Hex – ВК.
 - Задать программу амплификации (см. ниже) и нажать **ОК**.

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	40
	59	60 с	Rox, Hex	

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название теста – **Кукуруза-NOS-количество**, 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 терминатора NOS и ДНК кукурузы

(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. 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+.

Расчет количественного содержания генетически модифицированной кукурузы в анализируемых образцах.

Проводится в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS) на базе Excel.

1. Открыть программу «ГМИ-квант (вариант NOS)_шаблон». Не отключать макросы.
2. Сохранить файл с расширением **Книга Microsoft Excel**, указав дату анализа.
3. Перейти на лист **Экспорт**.
4. Скопировать результаты из программы для «ДТ-96». Для этого правой кнопкой мыши щёлкнуть по полю с таблицей результатов и выбрать **Копируем содержимое таблицы в Clipboard**. Затем открыть/создать документ в формате Excel и вставить туда результаты.
5. Значения Ct по каналам Rox и Hex из документа с результатами в формате Excel перенести на лист **Экспорт** программы «ГМИ-квант» (вариант NOS) в соответствующие столбцы **Ct** полей **Rox** и **Joe**. Канал **Hex** является аналогом канала **Joe**. В столбец **Name** вставить соответствующие названия образцов.
6. В программе «ГМИ-квант» (вариант NOS) перейти на лист **Результаты**.
7. В таблицу 1 в верхнем левом углу вставить значения **среднее DCt** для каждого калибровочного стандарта, выбрав их из столбца **среднее ΔCt**.
8. После ввода последнего значения автоматически произойдет расчет содержания ГМ кукурузы в тестируемых образцах, и эти значения появятся в столбце **% ГМИ**. Если результат больше, чем 5 % ГМ кукурузы, то он выдается как **содержание**

ГМ кукурузы более 5 %. Если результат меньше, чем 0,1 % ГМ кукурузы, то он выдается как **содержание ГМ кукурузы менее 0,1 %.**

Учет результатов

При получении значения **Ct** в таблице результатов для **ЭК (канал Нех)** для анализируемой пробы **более 34** требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если:

1. Получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 3.
2. Коэффициент корреляции (R^2), полученный в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS), **более 0,97.**
3. Полученные расчетные значения для **ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 %** и **калибровочных стандартов** укладываются в следующие доверительные интервалы:

Кст 0,1 %: $0,1\% \pm 0,025$;

Кст 1 % и ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 %: $1\% \pm 0,25$;

Кст 5 %: $5\% \pm 1,25$.

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct	
		по каналу Rox	по каналу Нех
В-	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	$\leq 35^*$	$\leq 27^*$

* При установке пороговой линии на уровне не более 10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала К+.

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения **Ct** в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции (В-) и для отрицательного контроля ПЦР (К+) на любом из каналов свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

2. Коэффициент корреляции (R^2), полученный в программе ГМИ-квант (вариант NOS), **менее 0,97**. Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.
3. Полученные расчетные значения для ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 % и калибровочных стандартов **не укладываются** в указанные доверительные интервалы (см. выше). Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.

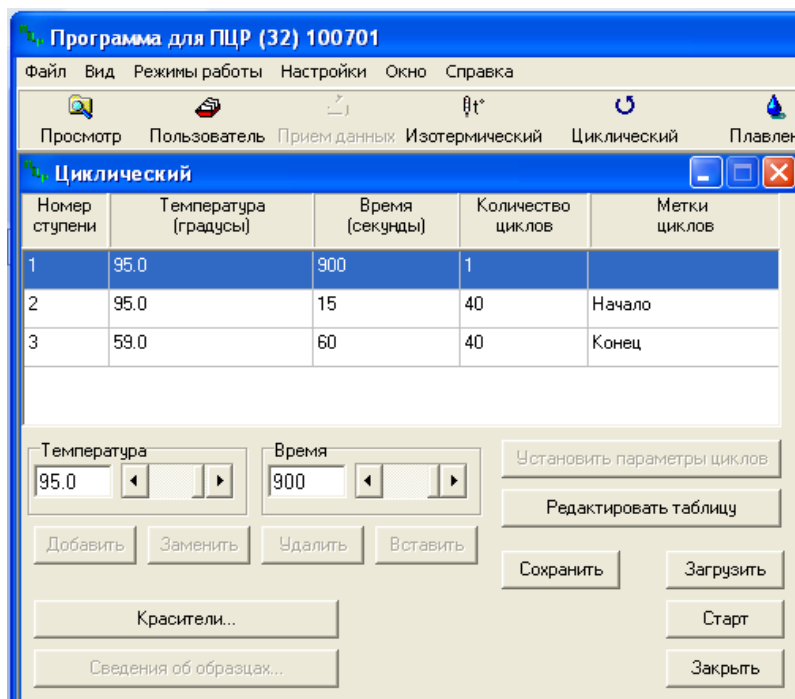
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ «АНК-16» и «АНК-32» («Синтол», Россия)

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

ВНИМАНИЕ! В приборе используются только пробирки со сферическими крышками.

Создание программы амплификации

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

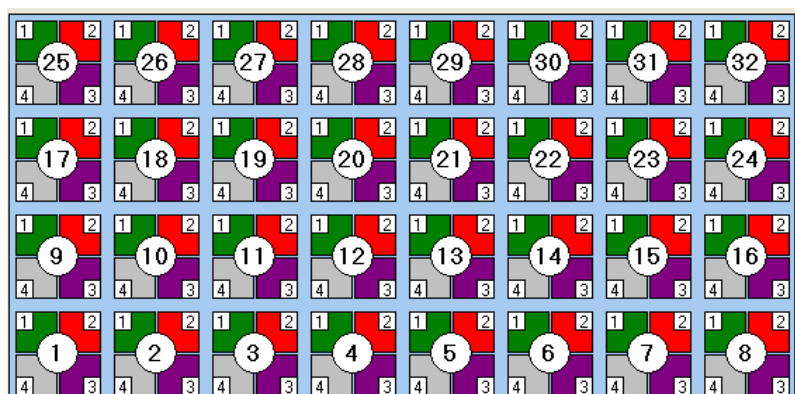


2. Температура и время каждого шага/ступени амплификации устанавливаются в нижней половине окна, с помощью клавиатуры или бегунков. После установки каждого значения необходимо нажать кнопку **Заменить**. Для изменения количества шагов используются кнопки **Добавить**, **Удалить** и **Вставить**.

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 используемые каналы детекции: **ROX**, **R6G**, затем нажать **OK**.
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 **OK**. Отметив в списке имя пользователя, нажать **Сохранить**. В появившемся окне ввести название программы (метода) – например, **Кукуруза-NOS-количество** – и нажать **OK**.

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**.
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 терминатора NOS и ДНК кукурузы (каналы ROX и R6G, соответственно).

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

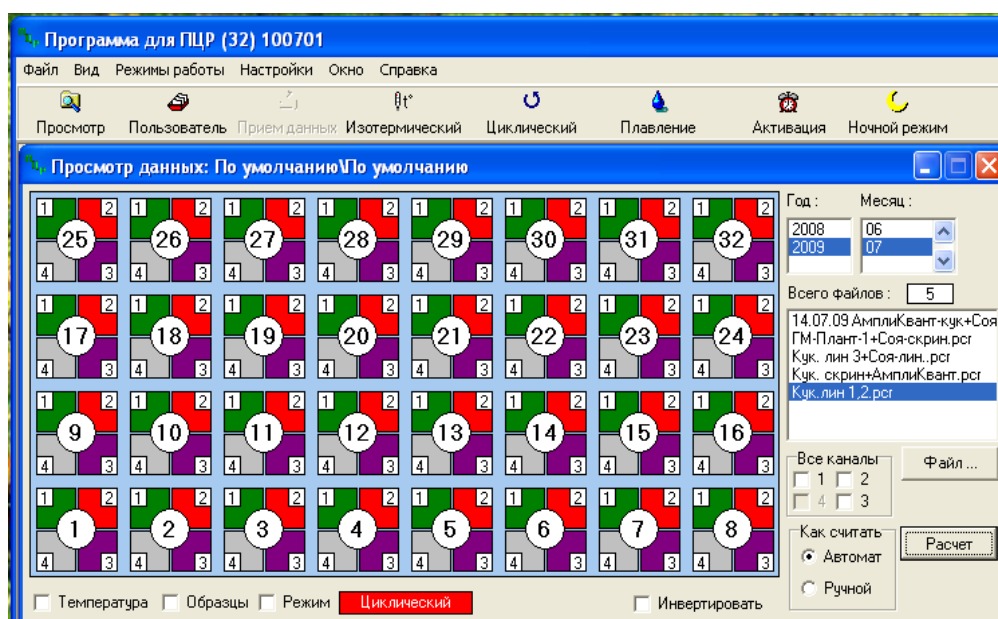
Параметр	Канал 1	Канал 2	Канал 3	Канал 4
Отношение максимум/минимум больше, чем :	1.300	1.300	1.300	1.300
Отношение между соседними точками меньше	2.100	2.100	2.100	2.100
Абсолютный рост по амплитуде больше, чем :	50	100	50	50
Порог :	0.000			
Расчет по последним точкам				
Отношение максимум/минимум 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			

Buttons: Применить и Выйти, OK, Отмена

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 *.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 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 текстового документа (ТХТ) 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 ≥ 40) считаются отрицательными.

Расчет количественного содержания генетически модифицированной кукурузы в анализируемых образцах

Проводится в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS) на базе Excel.

1. Открыть программу «ГМИ-квант (вариант NOS)_шаблон». Не отключать макросы.
2. Сохранить файл с расширением **Книга Microsoft Excel**, указав дату анализа.
3. Перейти на лист **Экспорт**.

4. Из предварительно сохранённого текстового документа с результатами (в формате TXT) скопировать значения *Ct* по каналам **ROX** и **R6G**. Вставить эти значения на лист **Экспорт** программы «ГМИ-квант» (вариант NOS) в соответствующие столбцы **Ct** полей **ROX** и **JOE**. Канал **R6G** является аналогом канала **JOE**. В столбец **Name** вставить соответствующие названия образцов.
6. В программе «ГМИ-квант» (вариант NOS) перейти на лист **Результаты**.
7. В таблицу 1 в верхнем левом углу вставить значения **среднее DCt** для каждого калибровочного стандарта, выбрав их из столбца **среднее ΔCt**.
8. После ввода последнего значения автоматически произойдет расчет содержания ГМ кукурузы в тестируемых образцах, и эти значения появятся в столбце **% ГМИ**.

Если результат больше, чем 5 % ГМ кукурузы, то он выдается как **содержание ГМ кукурузы более 5 %**. Если результат меньше, чем 0,1 % ГМ кукурузы, то он выдается как **содержание ГМ кукурузы менее 0,1 %**.

Учет результатов

При получении значения **Ct** в таблице результатов для **ЭК (канал R6G)** для анализируемой пробы **более 34** требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если:

1. Получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 4.
2. Коэффициент корреляции (R^2), полученный в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS), **более 0,97**.
3. Полученные расчетные значения для **ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 %** и **калибровочных стандартов** укладываются в следующие доверительные интервалы:
Кст 0,1 %: $0,1\% \pm 0,025$;
Кст 1 % и ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 %: $1\% \pm 0,25$;
Кст 5 %: $5\% \pm 1,25$.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу ROX	по каналу R6G
B-	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 33	≤ 27

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения **C_t** в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции (B-) и для отрицательного контроля ПЦР (K-) на любом из каналов свидетельствует о наличии контаминации реактивов. В этом случае результаты анализа положительных проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Коэффициент корреляции (**R^2**), полученный в программе «ГМИ-квант» (вариант NOS), **менее 0,97**. Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.
3. Полученные расчетные значения для ПКО ГМ кукуруза-NOS 1 % и калибровочных стандартов **не укладываются** в указанные доверительные интервалы (см. выше). Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
18.08.11 RT	Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»
	Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы
28.09.11 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
	По тексту	Добавлен раздел «Меры предосторожности» с таблицей реагентов, подлежащих маркировке, как содержащих опасные вещества
14.03.12 IV	По тексту	Изменено название отрицательного контроля экстракции с ОК на В–
	Титульная страница	символ IVD , обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики» заменен на символ RUO «только для исследовательских целей»
08.10.12 LA	П. Расчет количественного содержания генетически модифицированной кукурузы в анализируемых образцах (для всех используемых приборов)	Удалена фраза «Линейный диапазон измерения набора реагентов: от 0,1 % до 5 % ГМ кукурузы»
	Результат ПЦР-исследования считается достоверным (для всех используемых приборов)	Уточнены доверительные интервалы для калибровочных стандартов и ПКО ГМ кукуруза – NOS 1%
22.07.13 ME	Назначение	Добавлена таблица «Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции».
	Меры предосторожности	Изменено написание ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. «Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности» на ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».
	По тексту	Названия каналов детекции прописаны для каждой модели приборов в соответствии с протоколом № 20 от 26.02.13
28.01.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
04.02.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
13.04.15 ChA	Меры предосторожности	Откорректирована таблица с опасными реагентами
12.11.15 PM	Меры предосторожности	Раздел актуализирован в соответствии с шаблоном