

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
набора реагентов
АмплиСенс[®] ГМ кукуруза-линии-1-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	3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	8
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)	10
СОСТАВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	10
А. Подготовка проб для проведения амплификации	10
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов.	11
В. Интерпретация результатов.....	11
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	14
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	14
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	16
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ГМ	- генетически модифицированный
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
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[®] ГМ кукуруза-линии-1-FL далее – набор реагентов, не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для идентификации ДНК линий генетически модифицированной кукурузы MON810, NK603, T25, TC1507 и MON89034 в продуктах питания, кормах для животных и растительном сырье методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения в исследуемых образцах ДНК кукурузы и хотя бы одного из регуляторных элементов: P-35S и T-NOS, с помощью набора реагентов АмплиСенс[®] ГМ кукуруза-FL или АмплиСенс[®] ГМ Планта-1-FL.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Изготовителем.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала и одновременной амплификации участков ДНК генетически модифицированных кукурузы, продуктов питания, кормов для животных и растительного сырья с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится

реакция амплификация участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 5 реакций амплификации. Результат амплификации ДНК регистрируется по пяти различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	MON810	NK603	T25	TC1507	MON89034

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 1 предназначена для проведения реакции амплификации и идентификации ДНК линий генетически модифицированной кукурузы с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность	<p>Набор реагентов обнаруживает ДНК линий генномодифицированной кукурузы MON810, NK603, T25, TC1507 и MON89034.</p> <p>Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК не генномодифицированной кукурузы и других растений, ДНК животных, а также ДНК генномодифицированных линий <u>кукурузы</u> 3272, 4114, 5307, 59122, 98140, Bt11, Bt176, DAS-40278-9, GA21, MIR162, MIR604, MON810, MON863, MON88017, MON89034, NK603, T25, TC1507, VCO-O1981-5; <u>сои</u> 40-3-2, 305423, A2704-12, A5547-127, CV-127, DAS-44406-6, DAS-68416-4, DAS-81419-2, DP-356043, FG72, MON87701, MON89788, Syht0h2, <u>риса</u> LL62, <u>свеклы</u> H7-1, <u>картофеля</u> AM04-1020, <u>рапса</u> 73496</p>
Предел детекции, Limit of detection, LOD	<p>10³ копий ДНК/мл для последовательностей ДНК-мишеней для идентификации линий кукурузы MON810, NK603, T25, TC1507 и MON89034</p> <p>в 300 нг кукурузной ДНК: 0,01% ГМ кукурузы MON810 0,01% ГМ кукурузы NK603 0,01% ГМ кукурузы T25 0,01% ГМ кукурузы TC1507 0,01% ГМ кукурузы MON89034</p>

Набор реагентов разработан в соответствии с требованиями ISO 21569:2005, ISO 21571:2005 (ГОСТ Р ИСО 21571-2014), ISO 24276:2006 (ГОСТ Р 53214-2008).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования продуктов, содержащих растительные компоненты или растительное сырье, с соблюдением 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», и ГОСТ Р 53214-2008 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным.

Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром².
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

² Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации:

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» FRT-50 F:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc.

- («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 5 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), и другие, рекомендованные Изготовителем).
 8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими указаниями 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».

Материалом для исследования служат образцы ДНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, содержащие последовательность ДНК кукурузы, промотора P-35S и/или T-NOS.

Допускается хранение образцов ДНК до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – 1 неделя;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-линии-1	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
К+ ГМ кукуруза-линии-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**А. Подготовка проб 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, объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL ГМ кукуруза-линии-1,

- перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-линии-1, ПЦР-буфер-С и полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:
 - **10 мкл ПЦР-смеси-FL ГМ кукуруза-линии-1;**
 - **5 мкл ПЦР-буфера-С;**
 - **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**
 3. Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки.
 4. Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по **10 мкл ДНК** исследуемых образцов.
- ВНИМАНИЕ!** При добавлении проб ДНК, экстрагированной с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
5. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ГМ кукуруза-линии-1**.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов.

Порядок работы с помощью приборов **Rotor-Gene 6000** (Corbett Research, Австралия) и **Rotor-Gene Q** (QIAGEN, Германия) смотрите в **Приложении 1**.

Порядок работы с помощью прибора «**ДТ-96**», «**ДТпрайм**» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) смотрите в **Приложении 2**.

Порядок работы с помощью прибора **CFX96** (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) смотрите в **Приложении 3**.

В. Интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Таблица 2

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	MON810	NK603	T25	TC1507	MON89034

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов, при этом кривая флуоресценции данной пробы должна однократно пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК ГМ кукурузы линии MON-810 **обнаружена**, если для данной пробы по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t ;
- ДНК ГМ кукурузы линии NK-603 **обнаружена**, если для данной пробы по каналу для флуорофора JOE определено значение C_t ;
- ДНК ГМ кукурузы линии T-25 **обнаружена**, если для данной пробы по каналу для флуорофора ROX определено значение C_t ;
- ДНК ГМ кукурузы линии TC1507 **обнаружена**, если для данной пробы по каналу для флуорофора Cy5 определено значение C_t ;
- ДНК ГМ кукурузы линии MON89034 **обнаружена**, если для данной пробы по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение C_t .

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапа амплификации ДНК в соответствии с табл. 3.

Результаты для контролей ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 25	≤ 25	≤ 25	≤ 25	≤ 25

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 3) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 3) определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 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. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL ГМ кукуруза-линии-1, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-линии-1, ПЦР-буфер-С и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-линии-1 хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

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.ru³.

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

LOT

Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

RUO

Только для исследовательских и иных немедицинских целей



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

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

Для работы с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q следует использовать 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 для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
4. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
5. Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
6. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**) и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2 ml Tubes/Locking Ring attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

7. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
8. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling1/Циклирование1	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, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	
	72	10 с	–	

9. Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
10. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн**. В открывшемся окне **Auto Gain Calibration Setup/Автоматизация уровня сигнала** нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**, пометить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. 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/Автоматизация 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 роторе. 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

Анализ результатов амплификации (канал FAM/Green):

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. 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**).
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Канал	<i>Threshold/ Порог</i>	<i>Dynamic tube/ Динамич.фон</i>	<i>Slope Correct/ Коррект. уклона</i>	<i>More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов</i>
FAM/Green	0,05	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,05	включена	включена	10%
ROX/Orange	0,05	включена	включена	10%
Cy5/Red	0,05	включена	включена	10%
Cy5.5/Crimson	0,05	включена	включена	10%

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3 или выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. 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/Редактировать 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 –** отметить галочкой **образец, контроль +, контроль –.**
 - **Контроли: положительный (K+) – 1, отрицательный (K–) – 1.**
 - **Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл.**
 - **Флуорофоры – Fam – специфика; Hex – специфика; Rox – специфика, Cy5 – специфика, Cy5.5 – специфика.**
 - **Задать программу амплификации.** Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	61	20 с	–	
	72	10 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	25 с	Fam, Hex/R6G, Rox, Cy5, Cy5.5	
	72	10 с	–	

4. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
5. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «ГМ-идентификация», указать количество образцов и нажать **ОК**.
6. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
7. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
8. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.

9. Последовательно нажать кнопки **Закрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

Анализ результатов

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс для версии программы v.7.5. и выше)**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.

4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:

- **Критерии достоверности результата:** поставить галочку, **нижняя граница/порог положительного результата – 10%, верхняя граница/порог нормализации данных – 10%.**
- **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).

Нажать кнопку **Применить**.

5. Отключить **Фитирование** (сглаживание) данных при помощи кнопки **Φ** (отжать кнопку).

6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем, и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне **5-10 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца **K+** в последнем цикле амплификации.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл.

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	61	20 с	–	
	72	10 с	–	
3	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar 705	
	72	10 с	–	

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. ниже). Нажать **OK**.

1	95,0	C for 15:00
2	95,0	C for 0:10 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3	61,0	C for 0:20 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	72,0	C for 0:10 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5	GOTO 2 , 9 more times	
6	95,0	C for 0:10 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
7	54,0	C for 0:20 + Plate Read Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
8	72,0	C for 0:10 Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
9	GOTO 6 , 34 more times	
END		

4. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

5. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar705** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
 6. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
 7. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.
- ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.
8. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Анализ результатов

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
3. Для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне **5-10 %** от максимального значения флуоресцентного сигнала

образца **K+**. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

Примечание – Чтобы выделить график образца **K+** (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
26.02.20 VA	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалена фраза о разуконплектации набора реагентов
	Гарантийные обязательства изготовителя	Изменен электронный адрес для направления рекламаций
24.04.20 KK	Титульный лист	Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Назначение	Добавлена фраза «не является медицинским изделием»