

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс[®] ГМ соя-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	9
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F).....	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	10
А. Подготовка пробирок для 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
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	15
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
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
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс[®] ГМ соя-линии-1-FL не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для идентификации линий генетически модифицированной сои 40-3-2 (Roundup Ready, устойчивой к глифосату, «Монсанто Ко», США), A5547-127 и A2704-12 (устойчивых к глифосинату аммония, «Байер КрокСайенс», ФРГ), FG72 (устойчивой к глифосату и изоксафлютолу, «Байер КрокСайенс», США) и Syht0h2 (устойчивой к глюфосинату аммония и мезотриону, «Сингента», Швейцария) в продуктах питания и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения в исследуемых образцах ДНК сои и хотя бы одного из регуляторных элементов: P-35S и T-NOS, с помощью набора реагентов «АмплиСенс[®] ГМ соя-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала с использованием комплектов реагентов, рекомендованных Изготовителем.

ПРИНЦИП МЕТОДА

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится амплификация участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам 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. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

Результат амплификации ДНК регистрируется по пяти различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	A5547-127	40-3-2	A2704-12	FG72	Syht0h2

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

Форма 1

Включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F. Рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность	Набор реагентов обнаруживает ДНК линий генномодифицированной сои 40-3-2, A5547-127, A2704-12, FG72, Syht0h2. Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между ДНК линий генномодифицированной сои 40-3-2, A5547-127, A2704-12, FG72, Syht0h2. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК не генномодифицированной сои и других растений, ДНК животных, а также с ДНК генномодифицированных линий <u>кукурузы</u> 3272, 4114, 5307, 59122, 98140, Bt11, Bt-176, DAS-40278-9, GA21, MIR162, MIR604, MON810, MON863, MON88017, MON89034, NK603, T25, TC1507, VCO-O1981-5; <u>соя</u> 305423, DAS-68416-4, DAS-44406-6, DAS-81419-2, DP-356043, <u>риса</u> LL62, <u>свеклы</u> H7-1, <u>картофеля</u> AM04-1020
Предел детекции, Limit of detection, LOD	10 ³ копий ДНК/мл для последовательностей ДНК-мишеней для идентификации линий сои 40-3-2, A5547-127, A2704-12, FG72, Syht0h2. в 100 нг соевой ДНК: 0,01% ГМ сои 40-3-2 0,01% ГМ сои A5547-127 0,01% ГМ сои A2704-12 0,01% ГМ сои FG72 0,01% ГМ сои Syht0h2

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

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 требований 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:

- 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.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты, насадки для блендера и т.п.), использованные для приготовления проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и, после отмыwania в проточной и деионизованной воде, высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
- 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

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

² Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

- 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.
 - 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 и обратиться за медицинской помощью.

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

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

Специфические воздействия комплекта 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-комплексом» вариант FRT-50 F:
 - а) одноразовые полипропиленовые 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 круглой 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 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (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

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, содержащие последовательность ДНК сои, 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 не выше минус 16 °С – в течение года.

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».

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

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL ГМ соя-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 соя-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.

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»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL ГМ соя-линии-1, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смеси-FL ГМ соя-линии-1, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF) из расчета на каждую реакцию:
 - 10 мкл ПЦР-смеси-FL ГМ соя-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 микропробирки.
4. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по **10 мкл ДНК** исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

5. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
 - а) **положительный контроль (K+)** – внести в пробирку **10 мкл K+ ГМ соя-линии-1**.
 - б) **отрицательный контроль (K-)** – вместо ДНК пробы внести в пробирку **10 мкл K-**.

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**» (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 5 каналам:

Таблица 2

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	A5547-127	40-3-2	A2704-12	FG72	Syht0h2

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. Принцип интерпретации результатов следующий:

1. В образце обнаружена ДНК ГМ сои линии **A5547-127**, если в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM для него определено значение порогового цикла *Ct*.
2. В образце обнаружена ДНК ГМ сои линии **40-3-2**, если в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE для него определено значение порогового цикла *Ct*.
3. В образце обнаружена ДНК ГМ сои линии **A2704-12**, если в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX для него определено значение порогового цикла *Ct*.
4. В образце обнаружена ДНК ГМ сои линии **FG72**, если в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5 для него определено значение порогового цикла *Ct*.
5. В образце обнаружена ДНК ГМ сои линии **Syht0h2**, если в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 для него определено значение порогового цикла *Ct*.

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

Таблица 3

Результаты для контролей ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
K-	ПЦР	отсутству ет	отсутству ет	отсутству ет	отсутству ет	отсутству ет
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. таблицу 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. таблицу 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. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL ГМ соя-линии-1, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL ГМ соя-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 соя-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.ru)³.

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

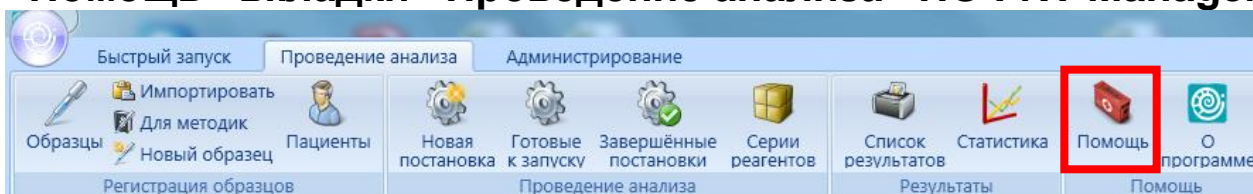
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Только для исследовательских и иных немедицинских целей		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

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

Для работы 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 англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора Rotor-Gene (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.

Программирование амплификатора:

4. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
5. В открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер** и шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
6. Выбрать тип ротора **36-Well Rotor/36-луночный ротор (или на 72 лунки 72-Well Rotor/72-луночный ротор)**. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
7. Нажать кнопку **Next/Далее**.
8. Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить её с помощью мышки).
9. Нажать кнопку **Next/Далее**.
10. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого в верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
11. Задать следующие параметры эксперимента:

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	10 с	–	10
	61	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling2/Циклирование2	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5.5/Crimson	
	72	10 с	–	

12. Нажать кнопку **OK/Да**.

13. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать

кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне **Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала** нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. 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/Авто-оптимизация уровня сигнала**, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

14. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

15. 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 амплификации по каналу 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. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.

3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).

4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope**

Correct/Коррект.уклона.

5. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,05**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quantitation Results/Количественные Результаты**) появятся значения **St**.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

ВНИМАНИЕ! В приборе используются только пробирки со сферическими крышками.

1. Включить прибор и запустить программу «RealTime_PCR» v.7.3 или выше. 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 (К+) – 1** , **отрицательный (К-) – 1**.
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – **25** мкл.
 - **Флуорофоры** – **Fam** - специфика; **Hex** - специфика; **Rox** – специфика, **Sy5** – специфика, **Sy5.5** – 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	20 с	Fam, Hex, 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 **Заккрыть 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:
- **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
 - **Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования**
 - **Критерии достоверности результата:** поставить галочку, **нижняя граница/порог положительного результата – 30 %**, **верхняя граница/порог нормализации данных – 30 %**.
 - **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).

Нажать кнопку **Применить**.

5. Отключить **Фитирование** (сглаживание) данных при помощи кнопки **Ф** (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 и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить ручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер, и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **5-10 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца **K+** в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

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.

Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые

накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **5-10%** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца **K+** в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. 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
21.03.18 ТА	Приложение 1	Добавлена информация про FRT manager
30.05.18 ТА	Форма Комплектации 1 («ПЦР-Комплект» Вариант FRT-50 F) Состав	Изменен цвет ПЦР-смеси-FL ГМ соя-линии-1 с «Прозрачная бесцветная жидкость» на «Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета»
25.02.19 SK	По тексту	Изменено форматирование текста
15.03.19 PM	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Срок годности изменен на 15 месяцев
03.09.19 DV	Принцип метода	Добавлена информация о системе защиты от контаминации за счет фермента УДГ
04.12.19 МА	Нижний колонтитул	Добавлен новый каталожный номер Форма 1: REF G-2721-1
27.02.20 VA	По тексту	Производитель заменен на Изготовителя
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалена фраза о разуконплектации набора реагентов
	Гарантийные обязательства изготовителя	Изменен электронный адрес для направления рекламаций
23.04.20 EM	Титульный лист	Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Назначение	Добавлено уточнение о том, что НР не является медицинским изделием