

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для идентификации генетически модифицированного риса

линии LL62 в продуктах питания и кормах для животных

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ГМ рис LL62-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
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ «АНК-16» и «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия)	16

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для идентификации генетически модифицированного риса линии LL62 (устойчивого к глюфосинату аммония, Aventis CropScience, США) в пищевой продукции, кормах для животных и растительном сырье методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов «АмплиСенс® ГМ рис LL62-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмБХ»), Германия),
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия),
- «АНК-16», «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
Канал для флуорофора FAM	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3

ВНИМАНИЕ! Программирование амплификатора и анализ результатов, полученных в программном обеспечении амплификатора, могут быть выполнены автоматически с помощью Программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия). Для работы следует использовать программу FRT Manager версии 2.0 или выше. **Для ознакомления со всеми возможностями ПО FRT Manager рекомендуем прочитать полное руководство пользователя. Данное руководство располагается в меню «Помощь» вкладки «Проведение анализа» ПО FRT Manager.**



См. также Методические Рекомендации по проведению амплификации и анализу результатов при помощи программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия).

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), 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.

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (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. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. 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**.
3. 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**.
4. В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
5. Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 1

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во 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	
	72	10 с	–	

6. Нажать дважды кнопку **ОК/Да**.
7. 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 FAM/Green 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**.
8. Запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в 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 ДНК ЭК рис (эндогенного контроля) (канал FAM/Green):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор пороговой линии для каждого из основных открывшихся окон (**FAM/Green** и **JOE/Yellow**) **Threshold/Порог**.
3. В меню каждого 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 СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации ДНК ГМ риса линии LL62 (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 СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Интерпретация результатов

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК риса линии LL62 **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла (*Ct*). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- ДНК риса линии LL62 **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow не определено (отсутствует) значение порогового цикла (C_t) (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла (C_t), не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла (C_t) по каналу JOE/Yellow, и по каналу FAM/Green значение C_t также не определено (отсутствует) или $C_t \geq 32$. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК риса.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Результаты анализа контрольных образцов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу FAM/Green	по каналу JOE/Yellow
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 19	≤ 22

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции и для отрицательного контроля ПЦР 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. Значения C_t для положительного контроля ПЦР (K+) отсутствуют или превышают граничные значения (см. табл. 2). Требуется повторное исследование всех отрицательных проб, начиная с этапа амплификации.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор и оптический модуль за 20-30 мин до проведения реакции.
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 **FAM/FAM-490** и **JOE/HEX/JOE-530**.
 - 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 **FAM-490** 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

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling1/Циклирование2	95	10 с	–	10
	61	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling2/Циклирование2	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530	
	72	10 с	–	

- 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 **iQ iCycler** 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 заданной программы амплификации 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 ДНК ЭК рис (эндогенного контроля) (канал FAM/FAM-490):

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 **FAM**. 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 **iQ iCycler** 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 **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. 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 ДНК ГМ риса линии LL62 (канал JOE/HEX/JOE-530):

1. Для прибора **iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**, отключив кнопку **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). 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 **iQ iCycler** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. 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**.

Интерпретация результатов

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК риса линии LL62 **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX/JOE-530 определено значение порогового цикла (Ct). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать

пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- ДНК риса линии LL62 **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/HEX/JOE-530 не определено (отсутствует) значение порогового цикла (C_t) (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу FAM определено значение порогового цикла (C_t), не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла (C_t) по каналу JOE/HEX/JOE-530, и по каналу FAM/FAM-490 значение C_t также не определено (отсутствует) или **$C_t \geq 32$** . В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК риса.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4

Результаты анализа контрольных образцов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу FAM/FAM-490	по каналу JOE/HEX/JOE-530
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 22	≤ 23

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции и для отрицательного контроля ПЦР 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. Значения C_t для положительного контроля ПЦР (K+) отсутствуют или превышают граничные значения (см. табл. 4). Требуется повторное исследование всех отрицательных проб, начиная с этапа амплификации.

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

ВНИМАНИЕ! В приборе используются только пробирки со сферическими крышками.

1. Включить прибор и запустить программу «RealTime_PCR v.7.3».

ВНИМАНИЕ! Для получения корректных результатов необходимо использовать обновлённую **версию программы 7.3.2.2**.

В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.

2. В диалоговом окне «Список приборов» выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.

3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – например, **ГМ идентификация** - и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:

- **Тип – качественный**
- **Метод – Пороговый (Ct)**
- **Пробирки – образец, контроль +, контроль –**
- Контроли: **положительный (K+) – 1, отрицательный (K-) – 1**
- Объем рабочей смеси в пробирке – **25 мкл**
- Флуорофоры – **Fam – ВК; R6G – специфика. Канал R6G выбрать из выпадающего списка, заменив канал Нех, выставленный по умолчанию.**
- Задать программу амплификации (см. ниже) и нажать **ОК**.

Таблица 5

Программа амплификации

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во 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	25 с	Fam, R6G	
	72	10 с	–	

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

5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.

6. Выбрать закладку **Запуск программы амплификации**, проверить параметры

теста. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов амплификации ДНК ЭК рис (эндогенного контроля) и ДНК ГМ риса линии LL62 (каналы Fam и R6G, 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+.
6. Результаты исследования (значения Ct по каждому из каналов) отображаются в таблице справа.

УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК риса линии LL62 **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу R6G определено значение порогового цикла (Ct). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК риса линии LL62 **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу R6G не определено (отсутствует) значение порогового цикла (Ct) (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу Fam определено значение порогового цикла (Ct), не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла (Ct) по каналу R6G и по каналу Fam

значение Ct также не определено (отсутствует) или $Ct \geq 32$. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК рнса.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6

Результаты анализа контрольных образцов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct	
		по каналу Fam	по каналу R6G (в таблице программы - Hex)
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 22	≤ 23

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции и для отрицательного контроля ПЦР 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. Значения Ct для положительного контроля ПЦР (K+) отсутствуют или превышают граничные значения (см. табл. 6). Требуется повторное исследование всех отрицательных проб, начиная с этапа амплификации.

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

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

ВНИМАНИЕ! В приборе используются только пробирки со сферическими крышками.

Создание программы амплификации

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

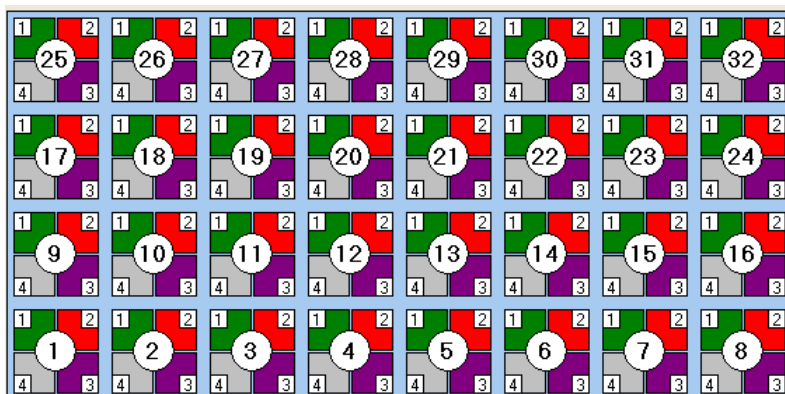
Таблица 7

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	900 с	–	1
Cycling1/Циклирование1	95	10 с	–	10
	61	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling2/Циклирование2	95	10 с	–	35
	54	20 с	FAM, R6G	
	72	10 с	–	

2. Температура и время каждого шага/ступени амплификации устанавливаются в нижней половине окна, с помощью клавиатуры или бегунков. После установки каждого значения необходимо нажать кнопку **Заменить**. Для изменения количества шагов используются кнопки **Добавить**, **Удалить** и **Вставить**.
3. Для установки параметров циклирования в том же окне нажать кнопку **Установить параметры циклов**. В появившемся окне для первого блока циклирования установить следующие значения: **Начало – шаг 2, Конец – шаг 4, Количество циклов – 10** и нажать кнопку **Применить**, затем установить значения для второго блока циклирования: **Начало – шаг 5, Конец – шаг 7, Количество циклов – 35** и нажать кнопку **Применить**.
4. В том же окне (**Циклический**) нажать кнопку **Красители** и в появившемся списке отметить используемые каналы детекции: **FAM, R6G**, затем нажать **ОК**.
5. Для сохранения программы амплификации в окне **Циклический** выбрать **Сохранить**. В открывшемся окне выбрать **Создать пользователя** или выбрать пользователя из списка в левом верхнем углу. При создании пользователя задать имя пользователя и нажать **ОК**. Отметив в списке имя пользователя, нажать **Сохранить**. В появившемся окне ввести название программы (метода) – например, **ГМ идентификация** – и нажать **ОК**.

Запуск амплификации.

1. Для запуска ранее созданной программы в окне **Циклический** выбрать **Загрузить**, далее соответствующего пользователя в левой части окна и название программы (метода) в правой (**ГМ идентификация**), далее нажать **Загрузить**.
2. В окне **Циклический** нажать кнопку **Сведения об образцах**. Задать названия образцов, используя строку ввода в правой части и кнопку **Задать** (над строкой ввода). С помощью функции **Кратность** можно указать число повторов одного образца (не более 3-х) для автоматического заполнения строк таблицы одноименными названиями. Тип всех образцов (список в правом верхнем углу) указывается, как **ИО** (испытуемый образец); этот тип образцов используется по умолчанию. Необходимо задать названия образцов для каждого используемого канала в отдельности, переключая вкладки каналов слева вверху окна. Доступна функция копирования и вставки списка образцов, заданного для одного канала на другие каналы (список копируется целиком, выделение не предусмотрено). После заполнения таблицы нажать **ОК**.
3. Открыть крышку прибора и установить пробирки со сферическими крышками в соответствующие ячейки, закрыть и завинтить крышку. Ячейки нумеруются следующим образом (вид сверху):



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

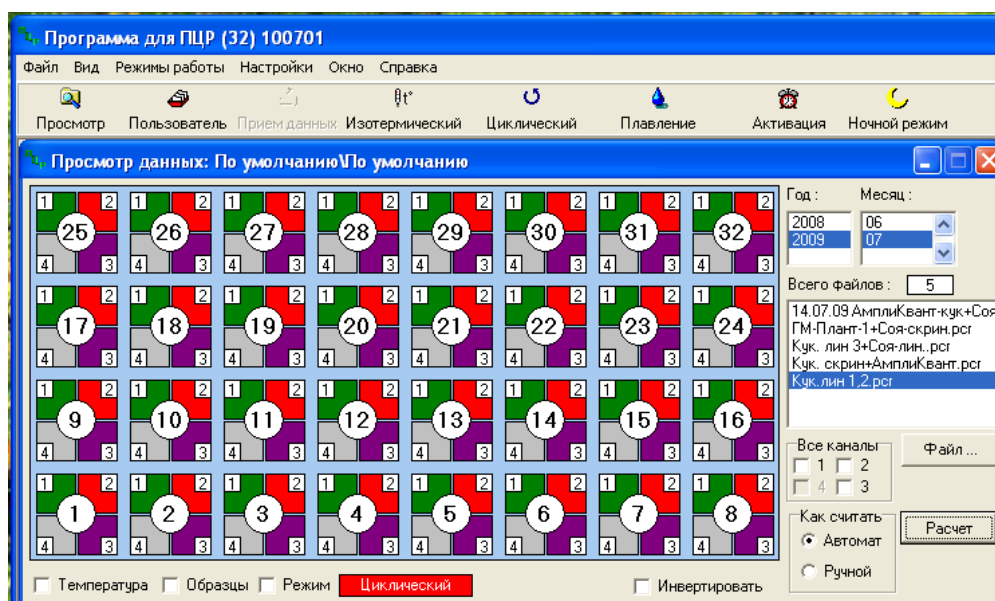
Анализ результатов амплификации ДНК ЭК рис (эндогенного контроля) и ДНК ГМ риса линии LL62 (каналы FAM и R6G, соответственно).

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

	Канал 1	Канал 2	Канал 3	Канал 4
Отношение максимум/минимум больше, чем :	1.300	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			

После установки параметров нажать **OK**. 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 **5** (если выставлено другое значение). Закрыть окно **Режим**.
4. В окне **Просмотр данных** выставить режим **Автомат**, если он не выбран, далее нажать кнопку **Расчет**. Появится окно с нормированными графиками и значениями пороговых циклов для всех ячеек по всем использованным каналам детекции. Для перехода на другую страницу нажать на кнопку с цифрой (соответствующей номеру первой показываемой в списке образцов ячейки) в верхнем правом углу окна. Для печати или сохранения результатов в формате текстового документа (TXT) нажать соответствующие кнопки в верхнем левом углу.

Интерпретация результатов

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК риса линии LL62 **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу R6G определено значение порогового цикла (C_t). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК риса линии LL62 **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу R6G не определено (отсутствует) значение порогового цикла (C_t) (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу FAM определено значение порогового цикла (C_t), не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла (C_t) по каналу R6G и по каналу для FAM

значение C_t также не определено (отсутствует) или $C_t \geq 32$. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК рнса.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей 8.

Таблица 8

Результаты анализа контрольных образцов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу FAM	по каналу R6G
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 19	≤ 22

Возможные ошибки:

1. Появление любого значения C_t в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции и для отрицательного контроля ПЦР 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. Значения C_t для положительного контроля ПЦР (K+) отсутствуют или превышают граничные значения (см. табл. 8). Требуется повторное исследование всех отрицательных проб, начиная с этапа амплификации.

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
09.08.11 RT	Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»
	Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы
27.09.11 VV	Титульная страница	Добавлены символ, наименование и адрес производителя
		Значок «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» перемещен в правый нижний угол страницы
		Удалена информация из нижнего колонтитула
01.09.12 LA	Титульная страница	Символ IVD , обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики», заменен на символ RUO «только для исследовательских целей»
	По тексту	Уточнения по шаблону
06.08.13 ME	Назначение	Добавлена таблица «Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции»
	По тексту	Названия разделов приведены в соответствие с шаблоном
		Названия каналов детекции прописаны для каждой модели приборов в соответствии с протоколом № 20 от 26.02.13
28.01.15 PM	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
03.02.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
21.03.18 TA	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)	Добавлена информация про FRT manager
25.07.18 PM	По тексту	«Учет результатов» замен на «Интерпретация результатов»
01.03.19 SK	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	Замена канала JOE/Yellow на канал FAM/Green. Правки по шаблону

	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи приборов iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	Замена канала JOE/HEX/JOE-530 на канал FAM/FAM-490. Правки по шаблону
	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи прибора «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	Замена канала R6G на канал Fam. Правки по шаблону
	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи приборов «АНК-16» и «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия)	Удален пункт 5 в подразделе Анализ результатов амплификации ДНК ЭК рис (эндогенного контроля) и ДНК ГМ риса линии LL62 (каналы FAM и R6G, соответственно). Замена канала R6G на канал FAM. Правки по шаблону