

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека




В.Г. Акимкин

« 09 » марта 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® Плант-контроль-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.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	9
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)	10
СОСТАВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	11
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	11
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	11
А. Подготовка проб для амплификации	11
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» », анализ результатов	12
В. Интерпретация результатов.....	13
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	15
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	15
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	16
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	17
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	21
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	25
ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....	28

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-G	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГМ	- генетически модифицированный
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ВКО	- внутренний контрольный образец
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
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
ЭК	- эндогенный контроль
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **АмплиСенс® Плант-контроль-FL** не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для контроля качества препаратов ДНК, полученных при проведении исследований на наличие генетически-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в продуктах питания, сырье и кормах для животных, с помощью выявления ДНК экзогенного внутреннего контроля (рекомбинантного препарата ВКО-G) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в режиме «реального времени».

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов материала, исследуемого на наличие генетически-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения, совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-G) и амплификации участка ДНК ВКО-G с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют

флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО-G

Тестирование препарата ДНК набором АмплиСенс® Плант-контроль-FL позволяет оценить качество проведения процесса экстракции ДНК и выявить причину неудовлетворительных результатов амплификации эндогенных внутренних контролей (ЭК) на этапе скрининга ГМО.

Возможны две схемы проведения контроля качества препаратов ДНК:

- параллельно этапу скрининга ГМО,
- после этапа скрининга ГМО.

При проведении контроля качества параллельно скринингу ГМО экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО-G) добавляется в образцы на этапе первичной экстракции ДНК, после чего в двух параллельных ПЦР-тестированиях на разных приборах проводятся скрининг ГМО и контроль качества препаратов ДНК. Данный вариант использования набора реагентов АмплиСенс® Плант-контроль-FL рекомендуется для образцов, в которых заведомо предполагается наличие большого количества ингибиторов ПЦР, а также для образцов продуктов с низким содержанием растительных компонентов в рецептуре (лецитин, БАДы, соусы, жировая продукция и др.).

Контроль качества препаратов ДНК после этапа скрининга ГМО проводится при получении на этапе скрининга неудовлетворительных результатов амплификации эндогенных контролей (ЭК). Для таких образцов необходимо провести повторную экстракцию ДНК с добавлением ВКО-G (на этапе

первичного скрининга ВКО-G не добавляется), после чего провести ПЦР-тестирование для контроля качества препаратов ДНК.

Обнаружение ДНК ВКО-G свидетельствует о качестве экстракции ДНК, приемлемом для анализа ГМО в образце методом ПЦР, то есть об эффективной очистке препарата ДНК от примесей. Результаты скрининга ГМО в таких образцах валидны, при условии получения корректных результатов по всем контрольным реакциям.

Если в образце не обнаружена растительная ДНК, а ДНК ВКО-G обнаружена, то следует считать, что образец изначально содержит недостаточное количество ДНК растительного происхождения для определения его методом ПЦР (например, вследствие деградации или удаления ДНК в процессе производства продукта питания). Анализ наличия ГМО в таких образцах методом ПЦР невозможен.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 1 предназначена для проведения реакции амплификации ДНК 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

Аналитические характеристики оценивались с использованием комплекта для экстракции «ДНК-сорб-С-М», комплекта для амплификации и детекции «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F и рекомбинантных препаратов ДНК.

Аналитическая специфичность	Набор реагентов обнаруживает ДНК ВКО-G. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК растений и животных.
Предел детекции, Limit of detection, LOD	10 ³ копий ДНК/мл

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

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».

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 реагентов строго по назначению.

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 реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не

¹ Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

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, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-С-М» или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

3. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - 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 ли 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.
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. 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).
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс)

- (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
7. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 8. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) и другие рекомендованные Изготовителем).
 10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
 12. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Рекомендации по взятию, транспортированию и хранению исследуемого материала, а также подготовке исследуемого материала к экстракции представлены в инструкциях к наборам реагентов для скрининга (например, «АмплиСенс ГМ кукуруза-FL», «АмплиСенс ГМ соя-FL», «АмплиСенс ГМ Плант-1-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации ДНК ВКО-G с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-FL Плант-контроль	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+ STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-G	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	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:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется набор реагентов «ДНК-сорб-С-М». Порядок работы с комплектом реагентов «ДНК-сорб-С-М» смотрите в инструкции к используемому комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-С-М»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-Г**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца для продуктов жидкой консистенции, суспензии – **100 мкл**, для гомогенатов – **30-100 мг** (что соответствует объему 30-50 мкл в градуированной пробирке емкостью 1,5 мл).

Каждый исследуемый образец рекомендуется тестировать в двух повторах.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка проб для амплификации

Выбор пробирок для проведения ПЦР 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 необходимое количество пробирок с ПЦР-

смесью-FL Планта-контроль, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **ПЦР-смесь-FL Планта-контроль**, **ПЦР-буфер-С** и **полимеразу (TaqF)** из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-FL Планта-контроль**;
- **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 на 0,2 мл.

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, 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+ STI-88**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

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

Порядок работы с помощью приборов **Rotor-Gene 3000**, **Rotor-Gene 6000** (Corbett Research, Австралия) и **Rotor-Gene Q** (QIAGEN, Германия) смотрите в **Приложении 1**.

Порядок работы с помощью приборов **iCycler iQ5** и **iCycler iQ** (Bio-Rad, США) смотрите в **Приложении 2**.

Порядок работы с помощью прибора **«ДТ-96»** (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) смотрите в **Приложении 3**.

Порядок работы с помощью прибора **«АНК-16»/«АНК-32»** (ЗАО «Синтол», Россия) смотрите в **Приложении 4**.

В. Интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по одному каналу:

Таблица 2

Канал для флуорофора	JOE
Продукт амплификации	ДНК ВКО-G

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 в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 3

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)				Результат
JOE				
Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q	iCycler iQ, iQ5	«ДТ-96»	«АНК-16», «АНК-32»	
отсутствует или $C_t > 32$	отсутствует или $C_t > 35$	отсутствует или $C_t > 35$	отсутствует или $C_t > 32$	ДНК ВКО-G НЕ обнаружена
$C_t \leq 32$	$C_t \leq 35$	$C_t \leq 35$	$C_t \leq 32$	ДНК ВКО-G обнаружена

Отрицательный результат амплификации ДНК ВКО-G может быть обусловлен недостаточно качественным проведением операций при экстракции ДНК, а также недостаточной очисткой препарата ДНК, полученного после этапа экстракции, от примесных веществ-ингибиторов (полисахариды, липиды, протеины, фенолы, соли). Влияние ингибиторов может быть устранено путем разбавления экстрагированного препарата ДНК в 5 раз, используя в качестве разбавителя К–.

Для разбавления отобрать 10 мкл выделенного препарата ДНК в чистую пробирку и добавить 40 мкл К–, полученный раствор используется далее для повторного проведения ПЦР с помощью набора реагентов АмплиСенс® Плант-контроль-FL. Если данная процедура не оказала заметного влияния на устранение ингибирования, а также, если на этапе экстракции

были допущены ошибки, следует повторить экстракцию с добавлением ВКО-G с последующим тестированием с помощью набора реагентов АмплиСенс® Плант-контроль-FL.

Препарат ДНК, полученный путем разведения или повторной экстракции, в котором обнаружена ДНК ВКО-G при тестировании с помощью набора реагентов АмплиСенс® Плант-контроль-FL, может быть использован для последующего проведения всех этапов анализа ГМО.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			
		JOE			
		Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q	iCycler iQ, iQ5	«ДТ-96»	«АНК-16», «АНК-32»
OK	Экстракция ДНК	Ct < 30	Ct < 33	Ct < 33	Ct < 30
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	Ct < 30	Ct < 33	Ct < 33	Ct < 30

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора JOE 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 каналу для флуорофора JOE 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 не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL Плант-контроль, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL Плант-контроль, ПЦР-буфер-С и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL Плант-контроль 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 Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

LOT

Код партии



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

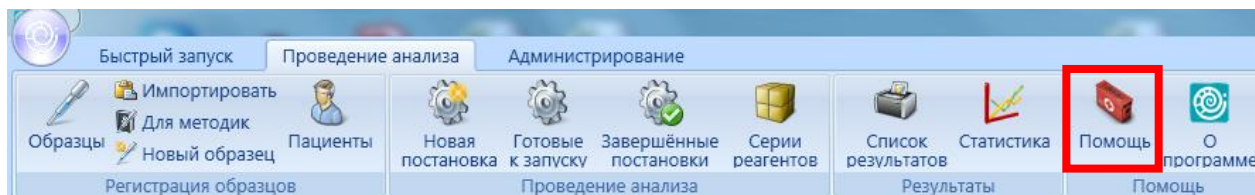


Дата изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (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 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.

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

- 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*).

- Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- 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 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- 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**.
- 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/Циклирование	95	10 с	–	40
	59	60 с	JOE/Yellow	

- Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
- 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. Демек-мых**, пометить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге демекции**. 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**.

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 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. 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** должна быть активирована кнопка **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 = 0.1**.
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 **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
2. Открыть программу iCycler.
3. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках:
 - Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналу **JOE**. 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 каналу **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:

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	15 с	–	42
	59	60 с	JOE/JOE-530	

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
 - Для прибора **iCycler iQ** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. 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** (например, 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 для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.
6. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета.
- Для прибора **iCycler 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

1. Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:
 - Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
 - Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
2. Анализ результатов проводить по каналу JOE.
3. В режиме анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию) 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.

4. Нажать кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или кнопку **Results** (iCycler iQ5) и вывести на экран таблицу результатов со значениями *Ct*.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

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

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор, 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, «Плант-контроль» – 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 – R6G –** специфика (канал R6G выбрать из выпадающего списка, заменив канал HEX, выставленный по умолчанию).
 - **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**.


Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	10 с	–	40
	59	60 с	R6G	

4. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
5. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «Плант-контроль», 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:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
 - **Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования**
 - **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. 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 4

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

1. 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. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
2. Выбрать пункт меню **Циклический**. В появившемся окне при нажатой (неактивной) кнопке **Редактировать таблицу** задать программу амплификации:

Цикл	Номер ступени	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	1	95	900 с	1
2	2	95	15 с	40
	3	59	60 с	

3. 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**.
4. Для установки количества циклов в окне **Циклический** нажать кнопку **Установить параметры циклов**. В появившемся окне установить следующие значения **Начало – шаг 2, Конец – шаг 3, Количество циклов – 40** и нажать кнопку **Применить**.
5. В том же окне (**Циклический**) нажать кнопку **Красители** и в появившемся списке отметить используемый канал детекции (**R6G**), затем нажать **ОК**.
6. 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) и нажать **ОК**.

Запуск амплификации.

1. Для запуска ранее созданной программы в окне **Циклический** выбрать **Загрузить**, далее - соответствующего пользователя в левой части окна и название программы (метода) в правой, далее нажать **Загрузить**.
2. В окне **Циклический** нажать кнопку **Сведения об образцах**. Задать названия образцов, используя строку ввода в правой части и кнопку **Задать** (над строкой ввода). С помощью функции **Кратность** можно указать число повторов одного образца (не более 3-х) для автоматического заполнения строк таблицы одноименными названиями. Тип всех образцов (список в правом верхнем углу) указывается, как **ИО** (испытуемый образец); этот тип образцов используется по умолчанию. Необходимо задать названия образцов для каждого используемого канала в отдельности, переключая вкладки каналов слева вверху окна. После заполнения таблицы нажать **ОК**.
3. Открыть крышку прибора и установить пробирки с выпуклыми крышками в соответствующие ячейки, закрыть и завинтить крышку.

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.

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

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

После установки параметров нажать **OK**. Данные установки сохранятся при следующем запуске программы **ПЦР**.

2. Нажать кнопку **Просмотр**. В правой части окна выбрать год и месяц данной постановки, ниже из списка выбрать имя искомого файла результатов.

3. В окне **Просмотр данных** отметить галочкой пункт **Режим**. В появившемся окне в пункте **Номер ступени для расчета** выставить значение **3** (если выставлено другое значение). Заккрыть 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.