

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс[®] ГМ кукуруза-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 И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	10
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	11
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)	13
СОСТАВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	14
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации.....	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов	15
В. Интерпретация результатов.....	15
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	18
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	18
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	19
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	24
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	28
ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ГМ	- генетически модифицированный
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
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
ЭК	- эндогенный контроль
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® ГМ кукуруза-FL, далее – набор реагентов, не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для выявления ДНК генетически модифицированной кукурузы в продуктах питания, кормах для животных и растительном сырье методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Изготовителем.

Анализ позволяет обнаруживать следующие фрагменты ДНК, широко встречающиеся у генетически модифицированных (ГМ) линий кукурузы:

- энхансер и промотор 35S Cauliflower mosaic virus (L-35S-CaMV / P-35S), а также другие промоторы, включающие в себя эти последовательности (P-e35S, P-4AS1, P-2xOCS35S, P-SCP1 и т.п.) – далее по тексту P-35S;
- терминатор гена нопалин-синтетазы из *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала и одновременной амплификации участков ДНК генетически модифицированной кукурузы и эндогенного контроля (ЭК кукурузы) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Эндогенный контроль (ген, специфичный как для трансгенной, так и нетрансгенной кукурузы) позволяет определять присутствие ДНК кукурузы в исследуемом образце и контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца.

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

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.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции амплификации. Результат амплификации ДНК регистрируется по 3 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК P-35S	ДНК кукурузы	ДНК T-NOS

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Аналитическая специфичность	<p>Набор реагентов обнаруживает последовательности ДНК гена, специфичного для генома кукурузы, P-35S, T-NOS.</p> <p>Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между ДНК растений, P-35S, T-NOS.</p> <p>Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК не генномодифицированных растений, ДНК животных, а также ДНК генномодифицированных линий кукурузы 3272, 4114, 5307, 59122, 98140, Bt11, Bt-176, DAS-40278-9, GA21, MIR162, MIR604, MON810, MON863, MON88017, MON89034, NK603, T25, TC1507, VCO-O1981-5; сои 305423, 40-3-2, A5547-127, A2704-12, DAS-68416-4, DAS-44406-6, DAS-81419-2, FG72, DP-356043, Syht0h2, риса LL62, свеклы H7-1, картофеля AM04-1020</p>
Предел детекции (Limit of detection, LOD)	<p>10^3 копий ДНК/мл последовательностей P-35S, T-NOS и ДНК кукурузы (ЭК)</p> <p>0,01% ГМИ в 100 нг ДНК кукурузы</p>

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 реактивы 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

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 с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

(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 отмывания в проточной и деионизованной воде, высушиваются в сушильном 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 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 по истечении срока годности.
- Использовать неопудренные одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. 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.
- Информационное письмо о безопасности доступно по запросу.

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

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

Предварительная подготовка исследуемого материала:

1. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
2. Отдельные для каждой пробы инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы).
3. Фарфоровая ступка с пестиком или гомогенизатор.
4. Одноразовые полиэтиленовые пакеты полиэтиленовые с застежкой Zip-lock (например, «Промсервис», Россия или аналогичные).
5. Измельчитель/мельница или блендер.
6. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200, и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
10. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
12. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус

24 до минус 16 °С.

14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемого материала:

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-С-М» или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации:

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) одноразовые полипропиленовые закручивающиеся 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)– при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), «АНК-16»/«АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия) или аналогичные).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими указаниями МУ 2.3.2.1917-04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически-модифицированные аналоги».

Материалом для исследования служат:

- кукурузное сырье (зерно, крупа, мука, изолят кукурузного белка и т.п.);
- продукты питания, содержащие кукурузные компоненты (каши, кукурузные хлопья, чипсы и т.п.);
- корма и кормовые добавки для животных, содержащие кукурузные компоненты;
- семена и посадочный материал.

Материалом для исследования НЕ могут служить:

- рафинированные растительные масла.

Отбор проб проводят согласно действующим национальным стандартам и другим регламентирующим документам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевого сырья, продуктов питания и кормов.

При отборе образцов соблюдают меры по предотвращению их загрязнения или изменения их состава.

Отбор образцов проводят с использованием одноразовых

перчаток, одноразовых или фламбированных инструментов, одноразовых герметично закрывающихся пластиковых контейнеров или пакетов.

Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение 1 мес (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным изготовителем продукта питания. Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре не выше минус 16 °С) в течение 1 мес (при необходимости повторного анализа).

Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

На этапе подготовки проб для исследования необходимо учитывать общие требования, описанные в ГОСТ Р ИСО 21571-2014 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот» и ГОСТ Р 55576-2013 «Корма и кормовые добавки. Метод качественного определения регуляторных последовательностей в геноме сои и кукурузы».

При подготовке проб должны быть приняты все меры по предотвращению загрязнения лабораторной пробы и изменения ее состава. Перед отбором пробы для анализа вся лабораторная проба должна быть гомогенизирована.

Для подготовки проб к гомогенизации необходимо использовать одноразовые или фламбированные инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы).

Пробы плотных продуктов, сухих гранулированных и сыпучих продуктов измельчают с использованием автоматических мельниц или блендеров. Для гомогенизации остальных продуктов используют автоматические гомогенизаторы или фарфоровые ступки и пестики. Сухие зерна предварительно замачиваются в течение суток.

Продукты, содержащие большое количество сахаров, специй

или соли на поверхности целевого продукта (кукурузные хлопья с медом или сахаром, сладкая кукуруза) требуют предварительной обработки:

- количество образца, отобранное для гомогенизации, предварительно следует промыть дистиллированной водой 2 раза, каждый раз удаляя воду.
- оставшееся плотное вещество затем использовать для гомогенизации.

Гомогенизированные пробы продуктов с высоким содержанием крахмалистых веществ весом 50-300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки, добавляют 1,0 мл физиологического раствора во избежание образования клейстера при добавлении лизирующего раствора. Пробы тщательно перемешивают, получая суспензию. Приготовление суспензии допускается также для вязких и пастообразных продуктов.

Из полученных гомогенатов и суспензий проводят экстракцию ДНК. Для этого пробы отбирают в одноразовые пластиковые пробирки (емкостью 1,5 мл) в количестве 30-100 мг (что соответствует объему 30-50 мкл в градуированной пробирке). Суспензии и продукты жидкой консистенции отбирают для экстракции в объеме 100 мкл.

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

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

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов;
- амплификация ДНК с гибридизационно-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».

Детальная информация по его использованию изложена в инструкции по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из биологического материала «ДНК-сорб-С-М». Каждый исследуемый образец рекомендуется тестировать в двух повторах. В качестве отрицательного контроля экстракции используют ОКО.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

- 1. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL ГМ кукуруза-скрин. Перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.**
- 2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке**
 - $10*(N+1)$ мкл ПЦР-смеси-FL ГМ кукуруза-скрин,**
 - $5*(N+1)$ мкл ПЦР-буфера-С,**
 - $0,5*(N+1)$ 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, 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) отрицательный контроль (K–) – внести в пробирку 10 мкл K–.**
 - б) положительный контроль (K+) – внести в пробирку 10 мкл K+ ГМ кукуруза-Flu.**
 - в) отрицательный контроль экстракции (OK) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной 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**», «**ДТпрайм**» (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 по 3 каналам:

Таблица 2

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК P-35S	ДНК кукурузы	ДНК T-NOS

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов). Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Канал для флуорофора	Значение порогового цикла	Результат
JOE	Определено значение $Ct \leq 35$	Обнаружена ДНК кукурузы
	Значение $Ct > 35$	Низкое содержание ДНК кукурузы
	Значение Ct отсутствует	ДНК кукурузы НЕ обнаружена
FAM	Определено значение Ct	Обнаружена ДНК P-35S
	Значение Ct отсутствует	ДНК P-35S НЕ обнаружена ³
ROX	Определено значение Ct	Обнаружена ДНК T-NOS
	Значение Ct отсутствует	ДНК T-NOS НЕ обнаружена ³

³ При значении Ct по каналу для флуорофора JOE ≤ 35

1. В образце обнаружена ДНК кукурузы (ЭК), если в таблице результатов по каналу **JOE/Yellow/Hex/R6G** для него определено значение порогового цикла $Ct \leq 35$;
2. В образце обнаружен энхансер и/или промотор 35S, если в таблице результатов по каналу **FAM/Green** для него определено значение порогового цикла Ct ;
3. В образце обнаружен терминатор NOS, если в таблице результатов по каналу **ROX/Orange** для него определено значение порогового цикла Ct ;
4. Результат анализа считается **невалидным**, если для данного образца не определено (отсутствует) или превышает 35 значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора JOE. В этом случае требуется повторное проведение анализа данной пробы, начиная с экстракции ДНК. При этом экстракция проводится с добавлением экзогенного контроля ВКО STI-87 для контроля качества полученного препарата ДНК с помощью набора реагентов «АмплиСенс[®] Плант-контроль-FL». При повторном получении аналогичного результата по каналу для флуорофора JOE и приемлемом качестве ДНК (см. инструкцию по применению набора реагентов «АмплиСенс[®] Плант-контроль-FL»), образец считать не подлежащим анализу из-за отсутствия или низкого содержания в нем ДНК кукурузы.

Внимание! В таких образцах присутствие Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или ROX может обозначать присутствие в образце ГМИ не кукурузного происхождения или другого источника маркеров **P-35S** и/или **T-NOS**.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 4).

Таблица 4

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 35	≤ 35	≤ 35

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. таблицу 4) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 4) 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, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 4) 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. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F (кроме ПЦР-смеси-FL ГМ кукуруза-скрин, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF)) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-скрин, ПЦР-буфер-С и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-скрин 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.ru⁴.

⁴ 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

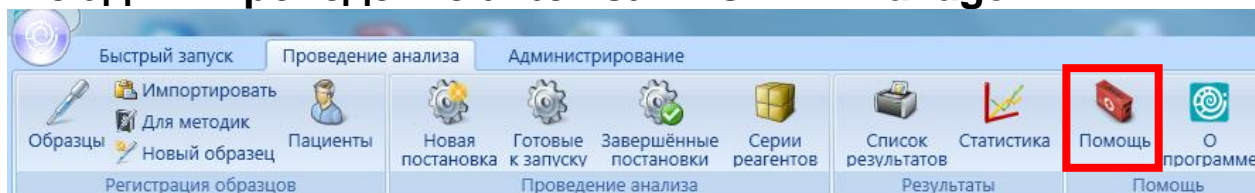


Дата изготовления

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.
2. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в

дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку.

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

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
4. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
5. Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
6. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
7. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
8. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	10 с	–	40
	59	60 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	

9. Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
10. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн**. В открывшемся окне **Auto Gain Calibration Setup/Автоматимизация 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. Закройте 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 FAM/Green):

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть

активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.

5. В меню **ST 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 меню **Eliminate cycles before:/Исключить циклы до:** (в правой части окна) выставить – **10**.
8. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **St**.

Анализ результатов по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange 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

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 каналам **FAM, JOE, ROX**. 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, JOE-530, ROX-575**. 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:

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	42
	59	60 с	FAM, JOE, ROX	

- 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 2 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (X.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 каналам FAM, JOE, ROX. Результаты обрабатывать для каждого канала по отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.
3. В режиме анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию) поочередно для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне **5-10 %** от максимального значения флуоресцентного сигнала образца **K+**. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

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

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», «ДТпрайм» (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, «ГМ-скрининг» – 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 (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать R6G) – ВК, Rox – специфика.**
4. 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	–	40
	59	60 с	Fam, Hex, Rox	


5. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.

6. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «ГМ-скрининг», указать количество образцов и нажать **ОК**.
7. 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**.
8. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
9. 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.

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

Анализ результатов

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс для версии программы v.7.5. и выше)**
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
 - **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. 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 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, °C	Время	Количество циклов
1	1	95	15 мин	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 (**FAM, R6G, ROX**), 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** (испытываемый 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 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).

Закрывать 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.

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
13.06.07	п. Транспортирование	Изменение условий транспортирования тест-системы: Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение пяти суток. При получении разукomплектовать.
21.12.07	По всему тексту	Изменение обозначения «тест-система» на «набор реагентов» Добавлен амплификатор «Rotor-Gene» 6000
	Программирование амплификатора «Rotor-Gene»	Добавлено программное обеспечение для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 Изменен порядок анализа результатов амплификации
04.07.08	По всему тексту	Добавлены формы комплектации
		Изменено название набора реагентов на «АмплиСенс® ГМ кукуруза-FL»
		Изменено наименование комплекта реагентов «АмплиСенс» на «ПЦР-комплект»
	п. Состав	Уточнено написание: ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора Методические рекомендации «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», Москва, 2008 г. Реагент ОКО перемещен из комплекта реагентов «ДНК-сорб-С» в комплект реагентов «ПЦР-комплект» Название реагента ПКО ГМ кукуруза FRT заменено на ПКО ГМ кукуруза Flu
Рекламации	Исправлен телефон ООО «ИнтерЛабСервис» – (495) 925-05-54	
29.09.08	п. Название	Уточнено название набора реагентов
20.11.08	п. Состав	Изменён объём ОКО с 1,6 мл на 1,2 мл, описание - бесцветная прозрачная жидкость
	п. Проведение ПЦР-амплификации и детекции продуктов ПЦР-амплификации	Уточнено проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе «iQ iCycler». Добавлено проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе «iQ5»
24.08.09	Нижний колонтитул	Указано соответствие каталожного номера и формы комплектации
12.02.10	п. Проведение ПЦР-амплификации	Добавлено проведение амплификации на приборах ДТ-96 и АНК-32
	Возможные ошибки	Уточнения по тексту
10.04.11 RT	По тексту	Изменен порядок разделов. Добавлены разделы: «Принцип метода», «Аналитические характеристики» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК». Удален раздел «Обеззараживание».
	—	Изменено полное название инструкции
	По тексту	Правки по тексту Добавлена информация, касающаяся выявления энхансера 35S (E35S)
	Принцип метода	Пункт изменен
	Аналитическая специфичность	Заменена на «Отсутствует положительная реакция при амплификации ДНК млекопитающих, птиц, рыб и растений, не принадлежащих к роду Zea (Кукуруза), также отсутствует положительная реакция по фрагментам E35S, P35S и NOS при тестировании образцов ДНК нетрансгенной кукурузы».
	В. Проведение	Раздел анализа результатов полностью заменен.

	амплификации и анализ результатов при использовании прибора iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США).	
	Г. Проведение амплификации и анализ результатов при использовании прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).	В п. 5 анализа результатов амплификации добавлена фраза «В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне 5-10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала ПКО».
	Интерпретация результатов	Уточнены каналы детекции. Добавлена таблица соответствия выявляемых последовательностей ДНК и используемых каналов детекции
	Возможные ошибки	Фраза «В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации» заменена на «В этом случае результаты анализа положительных образцов считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех положительных по данному каналу детекции проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации».
31.07.11 RT	По тексту	Добавлен раздел «Символы, используемые в печатной продукции»
		Изменено название института на ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
		«Вариант FRT» исправлен на «формат FRT»
		Исправления по шаблону
	Форматы и формы выпуска набора реагентов	Добавлена форма 3 – комплектация наборов оптом
	Меры предосторожности	СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» заменен на СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
	Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»
Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы	
28.09.11 VV	Титульная страница	Добавлены символ, наименование и адрес производителя
		Значок «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» перемещен в правый нижний угол страницы
	Меры предосторожности	Удалена информация из нижнего колонтитула Удалена таблица реагентов, подлежащих маркировке как содержащие опасные вещества
03.09.12 IV	Титульная страница	Замена символа «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» на символ «Только для исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
	Проведение амплификации и анализ	Изменено написание каналов для прибора «ДТ-96»

	результатов при использовании прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия)	
21.10.12 И	по всему тексту	уточнены названия фрагментов ДНК, встречающихся у ГМ линий кукурузы
	Принцип метода	указано, что в анализе определяется ЭК кукурузы
	Аналитические характеристики	Указан предел детекции 0,01% ГМО
		Изменен вид раздела
	Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК	изменена размерность: вместо копий ДНК/ПЦР указано копий ДНК/мл
		Объединена подготовка проб плотных и сухих гранулированных и сыпучих продуктов. Уточнена процедура их пробоподготовки: добавлена информация о необходимости замачивания сухих зерен, даны рекомендации по гомогенизации проб плотных продуктов с использованием автоматических гомогенизаторов
		Изменены количества (массы) отбираемых проб для анализа с 3-5 г на 5-10 г для плотных и сухих продуктов,
		Изменена масса отбираемых продуктов с высоким содержанием крахмалистых веществ с 10-30 мг на 50-300 мг, объем добавляемого физиологического раствора изменен с 0,1 на 1,0 мл.
		Количества проб для анализа изменены с 10-30 мг на 30-100 мг для полученных гомогенатов и с 50 мкл на 100 мкл для суспензий и продуктов жидкой консистенции и указаны отдельным пунктом
	Даны рекомендации отбирать и тестировать каждый исследуемый образец в двух повторах	
Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	Информация о необходимости тестирования каждого исследуемого образца в двух повторах удалена из данного раздела и указана в разделе «Экстракция ДНК из исследуемых образцов»	
	Добавлена информация о необходимости постановки отрицательного контроля экстракции (В-)	
Интерпретация результатов п. 3	«В образце обнаружен энхансер или промотор 35S...» изменено на «В образце обнаружен энхансер и/или промотор 35S...»	
Возможные ошибки	Добавлено: 2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла <i>Ct</i> отсутствует, необходимо повторить исследование всех отрицательных образцов, начиная с этапа амплификации	
Срок годности	Указан срок годности 9 месяцев	
29.01.15 СнА	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен адресат для направления рекламаций
	Символы, используемые в печатной продукции	Для символа RUO изменена фраза с «Только для исследовательских целей» на «Только для научно-исследовательских целей»

04.02.15 PM	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
30.06.16 PM	Дополнительные материалы и оборудование	Для прибора «Rotor-Gene Q» исправлено «Qiagen» на «QIAGEN GmbH»
	Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	
27.04.17 KM	Титульный лист	Изменено название набора реагентов, в т.ч. удалены кавычки, в адресе литеры «а» заменена на «А»
	Список сокращений	Добавлены сокращения «ДНК», «К+», «К-», «ОК», «ЭК». Удалено сокращение «ПКО»
	Назначение	Добавлен материал «растительное сырье» для исследования. Раздел дополнен
	Формы комплектации	Раздел переименован в «Формы комплектации». Удалены формы комплектации 2 и 3. Удалена фраза «включает комплект реагентов». Указано количество тестов, на которое рассчитана форма комплектации 1
	Аналитические характеристики	Набор для экстракции «ДНК-сорб-С» изменен на «ДНК-сорб-С-М». Добавлена информация в таблицу. Удален термин «аналитическая чувствительность». Добавлено соответствие нормативным документам
	Форма комплектации 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F). Состав	Изменены названия реагентов, объемы фасовки и количество пробирок в составе комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F: «ПЦР-смесь-1-FRT ГМ кукуруза-скрин» (0,11 мл x 6 пробирок) на «ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-скрин» (0,6 мл x 1 пробирка); «ПЦР-буфер-Flu» (0,35 мл) на «ПЦР-буфер-С» (0,3 мл); «ПКО ГМ кукуруза-Flu» на «К+ ГМ кукуруза-Flu»; «ТЕ-буфер» (0,5 мл) на «К-» (0,2 мл). Объем фасовки Полимеразы (TaqF) изменен с 0,035 мл на 0,03 мл
	Экстракция ДНК из исследуемых образцов	Набор для экстракции «ДНК-сорб-С» изменен на «ДНК-сорб-С-М»
	Амплификация с детекцией в режиме «реального времени»	Удалены подпункты Б, В, Г и Д. Добавлен подпункт «Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов». Подпункт «Интерпретация результатов» актуализирован
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен срок годности набора реагентов на 12 мес. Добавлены уточнения: «в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств», «в холодильных камерах», «в морозильных камерах», «Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим». Удалены условия хранения комплекта реагентов «ДНК-сорб-С»
	Гарантийные обязательства производителя	Раздел добавлен. Изменен адрес направления рекламаций на качество набора реагентов
Символы, используемые в печатной	Раздел актуализирован в соответствии с ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014	

	продукции	
	Приложения 1 – 4	Приложения добавлены
	По тексту	Актуализированы и разделы: «Принцип метода», «Меры предосторожности и сведения об утилизации», «Дополнительные материалы и оборудование», «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала», «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК». Правки по шаблону
	Нижний колонтитул	Добавлен каталожный номер для Формы 1 REF G-2851-1
03.05.17 КМ	По тексту	Изменено название, объем фасовки и количество пробирок реагента «ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-скрин» (0,6 мл x 1 пробирка) на «ПЦР-смесь-1-FRT ГМ кукуруза-скрин» (0,11 мл x 6 пробирок)
07.08.17 КМ	По тексту	Изменено название, объем фасовки и количество пробирок реагента «ПЦР-смесь-1-FRT ГМ кукуруза-скрин» (0,11 мл x 6 пробирок) на «ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-скрин» (0,6 мл x 1 пробирка)
05.02.18 ТА	ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F) В. Интерпретация результатов	Изменен пункт 4: уточнена интерпретация результата, добавлено Внимание!
21.03.18 ТА	Приложение 1	Добавлена информация про FRT manager
20.06.18 ТА	Форма комплектации 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F) Состав	Внесены правки по шаблону, уточнен цвет ПЦР-смеси-FL ГМ кукуруза-скрин
21.02.19 РМ	По тексту	Изменено форматирование текста
15.03.19 РМ	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Срок годности изменен на 15 месяцев
10.09.19 РМ	Принцип метода	Добавлена информация про фермент УДГ
05.03.20 ВА	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
21.04.20 ММ	Титульный лист	Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Назначение	Добавлена фраза «не является медицинским изделием»