

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

**АмплиСенс<sup>®</sup> ГМ соя-FL**

Только для исследовательских и иных немедицинских целей

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



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 .....   | 4  |
| ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ .....   | 5  |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....   | 5  |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....  | 5  |
| СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ .....   | 7  |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....  | 8  |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА                                      | 10 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК .....   | 11 |
| ФОРМА 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 проб для проведения амплификации .....   | 14 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»,<br>анализ результатов ..... | 15 |
| В. Интерпретация результатов .....   | 15 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....   | 19 |
| ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....   | 19 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....  | 20 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....  | 21 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....  | 25 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....  | 29 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....  | 32 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

|  |  |
|--|--|
| ВКО-G  | - экзогенный внутренний контрольный образец  |
| 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  |
| УДГ  | - урацил-ДНК-гликозилаза   |
| ФБУН ЦНИИ<br>Эпидемиологии<br>Роспотребнадзора | - Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»<br>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 соя-FL не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для выявления ДНК генетически модифицированной сои в продуктах питания, кормах для животных и растительном сырье методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Анализ позволяет обнаруживать следующие фрагменты ДНК, широко встречающиеся у генетически модифицированных линий сои:

- 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 *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS);
- энхансер и промотор 35S *Figwort mosaic virus* (L-35s-CMoVb / P-CMoVb (P-FMV)) – далее по тексту P-FMV;
- промотор гена рибулозобисфосфаткарбоксилазы *Arabidopsis thaliana* (P-rbcS);
- промотор гена ацетолактат-синтазы *Arabidopsis thaliana* (P-

- АНАS);
- модифицированный вариант кодирующей последовательности фосфинотрицин N-ацетилтрансферазы *Streptomyces viridochromogenes* (CS-pat).

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала и одновременной амплификации участков ДНК сои (эндогенный контроль), ВКО-G (экзогенный внутренний контрольный образец) и элементов трансгенных конструкций с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Эндогенный контроль (ген, специфичный как для трансгенной, так и нетрансгенной сои) позволяет определять присутствие ДНК сои в исследуемом образце и контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца.

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.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация четырех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

| Канал для флуорофора           |            | FAM                   | JOE        | ROX        | Sy5        |
|--------------------------------|------------|-----------------------|------------|------------|------------|
| Наименование ПЦР-смеси-FL      |            | Выявляемая ДНК-мишень |            |            |            |
| ПЦР-смесь-FL<br>ГМ соя-скрин 1 | ДНК-мишень | ДНК P-35S             | ДНК сои    | ДНК T-NOS  | ДНК P-FMV  |
| ПЦР-смесь-FL<br>ГМ соя-скрин 2 | ДНК-мишень | ДНК ВКО-G             | ДНК P-rbcS | ДНК P-ANAS | ДНК CS-pat |

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 1 предназначена для проведения реакции амплификации ДНК генетически модифицированной сои 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.

|  |  |
|--|--|
| <b>Аналитическая специфичность</b>               | Набор реагентов обнаруживает последовательности ДНК гена, специфичного для генома сои, P-35S, T-NOS, P-FMV, P-AHAS, P-rbcS, CS-pat.<br>Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между ДНК сои, P-35S, T-NOS, P-FMV, P-AHAS, P-rbcS, CS-pat.<br>Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК не генномодифицированных растений, ДНК животных, а также ДНК генномодифицированных линий <u>кукурузы</u> 3272, 4114, 5307, 59122, 98140, Bt11, Bt-176, DAS-40278-9, GA21, MIR162, MIR604, MON810, MON863, MON88017, MON89034, NK603, T25, TC1507, VCO-O1981-5; <u>сои</u> 305423, 40-3-2, A5547-127, A2704-12, CV-127, DAS-68416-4, DAS-44406-6, DAS-81419-2, DP-356043, FG72, MON87701, MON89788, Syht0h2, <u>риса</u> LL62, <u>свеклы</u> H7-1, <u>картофеля</u> AM04-1020, <u>рапса</u> 73496 |
| <b>Предел детекции (Limit of detection, LOD)</b> | 10 <sup>3</sup> копий ДНК/мл последовательностей P-35S, T-NOS, P-FMV, P-AHAS, P-rbcS, CS-pat и ДНК сои (ЭК)<br>0,01% ГМИ в 100 нг ДНК сои  |

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 фильтром<sup>1</sup>.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты, насадки для блендера и т.п.), использованные для приготовления проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и, после отмывания в проточной и деионизованной воде, высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых

---

<sup>1</sup> Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

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 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, упаковку<sup>2</sup>, биологический материал, а также 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

---

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

(пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

## **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 с застежкой Zip-lock (например, ООО «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», Россия, 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.



15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

**Экстракция ДНК из исследуемого материала:**

16. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-С-М» или другие, рекомендованные Изготовителем.

17. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

**Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации:**

18. 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 или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

20. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

22. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

23. Автоматические дозаторы переменного объема (например,

ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

24. 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), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем.
25. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
26. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
27. 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:

- соевое сырье (бобы, шрот, мука, изолят соевого белка и т.п.);
- соевые продукты (соевое мясо (фарш, колбаса, азу, котлеты и т.п.), соевые творог/сыр/паста, соевые напитки (молоко, йогурт, сливки и т.п.), соевые сухие напитки (растительные сливки, протеиновые коктейли и т.п.), соевые десерты (шоколад, крем и т.п.), детское питание (заменители молока, смеси));
- мясные продукты, содержащие соевые компоненты (фарш, вареные колбасы, сосиски, сардельки и т.п.);
- биодобавки, содержащие соевые компоненты;
- корма и кормовые добавки для животных, содержащие соевые 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 гомогенаты 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 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)****СОСТАВ**

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

| Реагент                     | Описание  | Объем,<br>мл | Количество |
|-----------------------------|---|--------------|------------|
| ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 1 | Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета | 0,6          | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 2 | Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета | 0,6          | 1 пробирка |
| ПЦР-буфер-С                 | Прозрачная бесцветная жидкость                              | 0,6          | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF)           | Прозрачная бесцветная жидкость                              | 0,06         | 1 пробирка |
| К+ ГМ соя 1                 | Прозрачная бесцветная жидкость                              | 0,2          | 1 пробирка |
| К+ ГМ соя 2                 | Прозрачная бесцветная жидкость                              | 0,2          | 1 пробирка |
| К-                          | Прозрачная бесцветная жидкость                              | 0,5          | 1 пробирка |
| ОКО                         | Прозрачная бесцветная жидкость                              | 1,2          | 1 пробирка |
| ВКО-G                       | Прозрачная бесцветная жидкость                              | 0,6          | 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 гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

**ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК используется комплект 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-Г – **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).

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 проведения 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 пробирки с ПЦР-смесью-FL ГМ соя-скрин 1 и ПЦР-смесью-FL ГМ соя-скрин 2, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 1 или ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 2, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF) из расчета на каждую реакцию:
  - **10 мкл ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 1 или ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 2;**
  - **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 (К1+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ГМ соя 1 для ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 1**.
- в) **положительный контроль ПЦР (К2+)** – внести в пробирку в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ГМ соя 2 для ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 2**.
- г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирки 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», «ДТпрайм»** (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) смотрите в **Приложении 3**.

Порядок работы с помощью прибора **CFX96** (Bio-Rad, США) смотрите в **Приложении 4**.

**В. Интерпретация результатов**

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по четырем каналам:

Таблица 2

| Канал для флуорофора        | FAM                  | JOE        | ROX        | Sy5        |
|-----------------------------|----------------------|------------|------------|------------|
| Наименование ПЦР-смеси-FL   | Продукт амплификации |            |            |            |
| ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 1 | ДНК P-35S            | ДНК сои    | ДНК T-NOS  | ДНК P-FMV  |
| ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 2 | ДНК ВКО-G            | ДНК P-rbcS | ДНК P-AHAS | ДНК CS-pat |

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 (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

**Интерпретация результатов ПЦР-исследования**

| Название ПЦР-смеси-FL          | Значение порогового цикла по каналу для флуорофора ( <i>Ct</i> ) |                                |                            |                            | Результат                                       |
|--------------------------------|--|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|---|
|                                | FAM  | JOE                            | ROX                        | Cy5                        |   |
| ПЦР-смесь-FL<br>ГМ соя-скрин 1 | определено или отсутствует                                       | <u>определено</u><br>≤35       | определено или отсутствует | определено или отсутствует | Обнаружена ДНК сои                              |
|                                | определено или отсутствует                                       | <u>определено</u><br>>35       | определено или отсутствует | определено или отсутствует | Низкое содержание ДНК сои <sup>3</sup>          |
|                                | определено или отсутствует                                       | отсутствует                    | определено или отсутствует | определено или отсутствует | ДНК сои НЕ обнаружена <sup>3</sup>              |
|                                | определено или отсутствует                                       | <u>определено</u><br>≤35       | <u>определено</u>          | определено или отсутствует | Обнаружена ДНК T-NOS                            |
|                                | определено или отсутствует                                       | <u>определено</u><br>≤35       | определено или отсутствует | <u>определено</u>          | Обнаружена ДНК P-FMV                            |
|                                | <u>определено</u>  | <u>определено</u><br>≤35       | определено или отсутствует | определено или отсутствует | Обнаружена ДНК P-35S                            |
| ПЦР-смесь-FL<br>ГМ соя-скрин 2 | определено или отсутствует                                       | <u>определено</u>              | определено или отсутствует | определено или отсутствует | Обнаружена ДНК P-rbcS                           |
|                                | определено или отсутствует                                       | определено или отсутствует     | <u>определено</u>          | определено или отсутствует | Обнаружена ДНК P-AHAS                           |
|                                | определено или отсутствует                                       | определено или отсутствует     | определено или отсутствует | <u>определено</u>          | Обнаружена ДНК CS-pat                           |
| ПЦР-смесь-FL<br>ГМ соя-скрин 1 | отсутствует  | определено или отсутствует     | отсутствует                | отсутствует                | ДНК P-35S, T-NOS, P-FMV, P-rbcS, P-AHAS, CS-pat |
| ПЦР-смесь-FL<br>ГМ соя-скрин 2 | <u>определено</u><br>≤32   | отсутствует                    | отсутствует                | отсутствует                | <b>НЕ обнаружена</b>                            |
| ПЦР-смесь-FL<br>ГМ соя-скрин 1 | отсутствует  | определено >35 или отсутствует | отсутствует                | отсутствует                | <b>Невалидный</b>                               |
| ПЦР-смесь-FL<br>ГМ соя-скрин 2 | определено >32 или отсутствует                                   | отсутствует                    | отсутствует                | отсутствует                |   |

<sup>3</sup> При значении *Ct* для ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 2 по каналу для флуорофора FAM ≤ 32.



**ВНИМАНИЕ!** В исследуемом образце, в котором не обнаружена ДНК сои или обнаружено низкое содержание ДНК сои, присутствие значений *Ct* по каналам детекции элементов трансгенных конструкций может означать наличие в данном образце ГМИ не соевого происхождения или другого источника маркеров **P-35S, T-NOS, P-FMV, P-rbcS, P-AHAS** и/или **CS-pat**. Такой образец не подлежит дальнейшему исследованию на идентификацию линий ГМ сои и количественному анализу.

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

Таблица 4

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

**ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 1**

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла по каналу для флуорофора ( <i>Ct</i> ) |             |             |             |
|----------|--------------------------------------|--|-------------|-------------|-------------|
|          |                                      | FAM  | JOE         | ROX         | Sy5         |
| OK       | Экстракция ДНК                       | отсутствует  | отсутствует | отсутствует | отсутствует |
| K-       | ПЦР                                  | отсутствует  | отсутствует | отсутствует | отсутствует |
| K1+      | ПЦР                                  | $\leq 30$  | $\leq 30$   | $\leq 30$   | $\leq 30$   |

**ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 2**

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла по каналу для флуорофора ( <i>Ct</i> ) |             |             |             |
|----------|--------------------------------------|--|-------------|-------------|-------------|
|          |                                      | FAM  | JOE         | ROX         | Sy5         |
| OK       | Экстракция ДНК                       | $\leq 32$  | отсутствует | отсутствует | отсутствует |
| K-       | ПЦР                                  | отсутствует  | отсутствует | отсутствует | отсутствует |
| K2+      | ПЦР                                  | $\leq 30$  | $\leq 30$   | $\leq 30$   | $\leq 30$   |

**Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля ПЦР (K1+/K2+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 4) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию с соответствующей ПЦР-смесью-FL для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.

2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 4), кроме канала FAM для ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 2, определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). 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 ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 4) определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). 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-50F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 1, ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 2, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 1, ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 2, ПЦР-буфер-С и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 1, ПЦР-смесь-FL ГМ соя-скрин 2 хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

## **ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ**

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: [obtk@pcr.ru](mailto:obtk@pcr.ru)<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

**REF**

Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

**LOT**

Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

**RUO**

Только для исследовательских и иных немедицинских целей



Использовать до

**VER**

Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

#### Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

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

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

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
4. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
5. Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
6. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**) и поставить галочку напротив

позиции **No Domed 0,2ml 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 в верхней части окна 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                 |
| Cycling/<br>Циклирование | 95              | 10 с   | –   | 40                |
|                          | 59              | 60 с   | FAM/Green,<br>JOE/Yellow,<br>ROX/Orange,<br>Cy5/Red |                   |

9. Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
10. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн**. В открывшемся окне **Auto Gain Calibration Setup/Автоматизация уровня сигнала** нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**, пометить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для всех красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение **5**, а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение **10**. В графе **Tube position/Позиция Пробирки** указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр **Gain/Усиление Сигнала**, по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Закрыть окно **Auto Gain Calibration Setup/Автоматизация уровня сигнала**, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

11. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
12. Дать название эксперименту 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 **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В меню **Eliminate cycles before:/Исключить циклы до:** (в правой части окна) выставить – **10**.

8. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

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

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



## 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

Примечание – Недопустимо проводить одновременную постановку амплификации с использованием набора реагентов АмплиСенс® ГМ соя-FL с детекцией по четырем каналам и других наборов реагентов с детекцией по трем и менее каналам на приборе **iQ5**.

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, Cy5**. 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, CY5-635**. 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, Cy5      |                   |

- 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 и Cy5. 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, «**Скрининг ГМО**» – и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
  - Тип – качественный.
  - Метод – Пороговый (Ct).
  - Пробирки – отметить галочкой образец, контроль +, контроль –.
  - Контроли: положительный (K1+) – 1, положительный (K2+) – 1, отрицательный (K–) – 1.
  - Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл.
  - **Флуорофоры** – **Fam** – для ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 1 – специфика, для ПЦР-смеси-FL ГМ соя-скрин 2 – ВК, **Hex** (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать **R6G**) – специфика, **Rox** – специфика, **Cy5** – 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, °C | Время  | Измерение флуоресценции | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------|-------------------|
| 1    | 95              | 15 мин | –                       | 1                 |
| 2    | 95              | 10 с   | –                       | 42                |
|      | 59              | 60 с   | Fam, Hex, Rox, Cy5      |                   |

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 **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. 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 ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

#### Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

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

| Цикл | Температура, °C | Время  | Измерение флуоресценции | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------|-------------------|
| 1    | 95              | 15 мин | –                       | 1                 |
| 2    | 95              | 10 с   | –                       | 42                |
|      | 59              | 60 с   | FAM, HEX, ROX, Cy5      |                   |

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

|     |                       |                                    |
|-----|-----------------------|------------------------------------|
| 1   | 95,0                  | C for 15:00                        |
| 2   | 95,0                  | C for 0:10                         |
|     |                       | Slow Ramp Rate to 2,5 C per second |
| 3   | 59,0                  | C for 1:00                         |
|     |                       | Slow Ramp Rate to 2,5 C per second |
| 4   | GOTO 2 ,41 more times |                                    |
| END |                       |                                    |

4. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
5. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor – New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX, Cy5** и нажать **OK**.



В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

6. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
7. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

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

8. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

### Анализ результатов

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
3. Для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне **5-10 %** от максимального значения флуоресцентного сигнала образца **K+**. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не

пересекать базовую линию.

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

**Лист вносимых изменений**

| <b>Редакция</b> | <b>Место внесения изменений</b>                     | <b>Суть вносимых изменений</b>   |
|-----------------|---|--|
| 03.09.19<br>DV  | Принцип методы                                      | Добавлена информация о системе защиты от контаминации за счет фермента УДГ                     |
| 26.02.20<br>VA  | Срок годности. Условия транспортирования и хранения | Удалена фраза о разуконплектации набора реагентов  |
|                 | Гарантийные обязательства изготовителя              | Изменен электронный адрес для направления рекламаций   |
| 21.04.20<br>MM  | Титульный лист                                      | Добавлена фраза «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»                      |
|                 | Назначение  | Добавлена фраза «не является медицинским изделием»   |
| 26.10.20<br>MA  | По тексту   | Замена ВКО-FL объемом 0,5 мл на ВКО-G объемом 0,6 мл, внесены правки в соответствии с шаблоном |