

«УТВЕРЖДАЮ»

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



[Signature]
В.Г. Акимкин

« 25 » *[Signature]* 2024 г.

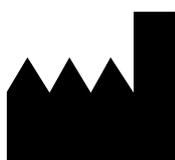
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® ГМ кукуруза-FL

Только для исследовательских и иных немедицинских целей

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

RUO

Только для исследовательских и
иных немедицинских целей

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	10
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	12
СОСТАВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	12
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	13
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации	13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	14
В. Интерпретация результатов.....	14
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
ГМИ	- генетически модифицированный ингредиент
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
СанПиН	- санитарные правила и нормы
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ЭК	- эндогенный контроль
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® ГМ кукуруза-FL 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 в режиме «реального времени».

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

Набор реагентов позволяет обнаруживать следующие фрагменты ДНК, широко встречающиеся у генетически модифицированных 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 амплификация участка ДНК 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 трех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

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

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма комплектации 1 рассчитана на 55 реакций амплификации, включая контроли, и используется для проведения амплификации ДНК генетически модифицированной кукурузы с гибридизационно-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 комплекта для экстракции ДНК-сорб-С-М, комплекта для амплификации и детекции «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F и рекомбинантных препаратов ДНК.

Аналитическая специфичность	Набор реагентов обнаруживает последовательности ДНК гена, специфичного для генома кукурузы, P-35S, T-NOS. Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между ДНК растений, P-35S, T-NOS. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК негенномодифицированных 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
Предел детекции (Limit of detection, LOD)	10 ³ копий ДНК/мл последовательностей P-35S, T-NOS и ДНК кукурузы (ЭК) 0,01% ГМИ в 100 нг ДНК кукурузы

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

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования продуктов, содержащих растительные компоненты или растительное сырье, с соблюдением требований 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 однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

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%.
- 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 сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный молекулярно-биологическим методам диагностики и правилам работы в лаборатории в установленном порядке.
- 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, упаковку¹, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо 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.
5. Измельчитель/мельница или блендер.
6. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
8. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного

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

- объема с фильтром до 200 и 1000 мкл.
10. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
 11. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. г.
 12. Автоматические дозаторы переменного объема.
 13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 14. Отдельный халат, шапочка, 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 выделения ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации:

18. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – 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 – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой – при использовании прибора роторного типа.
19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 1000 мкл.
20. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
22. Центрифуга-вортекс.
23. Автоматические дозаторы переменного объема.
24. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research,

Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ/iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), «АНК-16»/«АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия) и другие, рекомендованные Изготовителем).

25. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

26. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

27. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с 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 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 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» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
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

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов;
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется набор реагентов ДНК-сорб-С-М.

Порядок работы с комплектом реагентов ДНК-сорб-С-М смотрите в инструкции к данному комплекту для экстракции.

Экстракцию ДНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО.

Объемы реагентов и образцов:

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

Каждый исследуемый образец рекомендуется тестировать в двух повторах.

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

Объем элюции – **100 мкл**.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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.

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

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 **ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-скрин, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF)** из расчета на каждую реакцию:
 - **10 мкл ПЦР-смеси-FL ГМ кукуруза-скрин,**
 - **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 для ПЦР.
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**:
 - а) **отрицательный контроль (K–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K–**.
 - б) **положительный контроль (K+)** – в пробирку с

реакционной смесью внести **10 мкл K+ ГМ кукуруза-Flu.**

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

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

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью приборов iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) смотрите в Приложении 2.

Порядок работы с помощью приборов 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, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 2

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК Р-35S	ДНК кукурузы	ДНК T-NOS

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct*.

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 3.

Таблица 3

**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

При наличии отклонений результатов для контролей от указанных выше интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 4

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Канал для флуорофора	Значение порогового цикла	Результат
JOE	Определено значение Ct ≤ 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 ²
ROX	Определено значение Ct	Обнаружена ДНК T-NOS
	Значение Ct отсутствует	ДНК T-NOS НЕ обнаружена ²

1. В образце обнаружена ДНК кукурузы (ЭК), если в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE для него определено значение порогового цикла $Ct \leq 35$;
2. В образце обнаружен энхансер и/или промотор 35S, если в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM для него определено значение порогового цикла Ct ;
3. В образце обнаружен терминатор NOS, если в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX 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

² При значении Ct по каналу для флуорофора JOE ≤ 35

ДНК. При этом экстракция проводится с добавлением экзогенного контроля ВКО 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**.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 3) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК. Необходимо повторить ПЦР-исследование таких образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 3) определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 3) определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов,

исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов.

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.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (К+ ГМ кукуруза-Flu, К-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-скрин, ПЦР-буфер-С, полимераза (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.ru. 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

LOT

Код партии



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов

RUO

Только для исследовательских и иных немедицинских целей



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1**АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 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 приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q 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:

Цикл	Температура, °C	Время	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/Автоматизация уровня сигнала** нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Демек-мых**, пометить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге 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 по каналу FAM/Green:

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. 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** должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить 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 провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Канал	Threshold/ Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More Settings/Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	0,05	включен	включена	10%
JOE/Yellow	0,05	включен	включена	10%
ROX/Orange	0,05	включен	включена	10%

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 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. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора.

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. Задать схему планшета (расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках в исследуемых образцах):
 - 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). Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

5. 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**.
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 ПРИБОРОВ 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 **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 ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРОВ «АНК-16» и «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Россия)

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Запустить программу **ПЦР**. Нажать клавишу **Активация** для прогрева крышки прибора. Время прогрева прибора составляет 15-20 минут. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
2. Выбрать пункт меню **Циклический**. В появившемся окне при нажатой (неактивной) кнопке **Редактировать таблицу** задать программу амплификации:

Цикл	Номер ступени	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	1	95	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

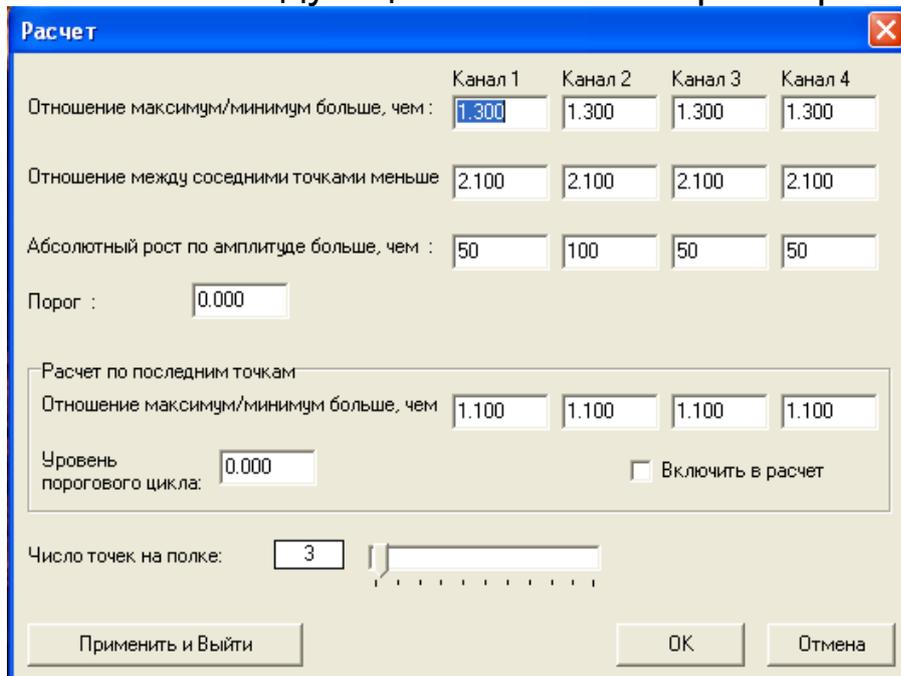
1. Для запуска ранее созданной программы в окне **Циклический** выбрать **Загрузить**, далее - соответствующего пользователя в левой части окна и название программы (метода) в правой, далее нажать **Загрузить**.
2. В окне **Циклический** нажать кнопку **Сведения об образцах**. Задать названия образцов, 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** (испытуемый образец); этот тип образцов используется по умолчанию. Необходимо задать названия образцов для каждого используемого канала в отдельности, переключая вкладки каналов слева вверху окна. Доступна функция копирования и вставки списка образцов, заданного для одного канала на другие каналы (список копируется целиком, выделение не предусмотрено). После заполнения таблицы нажать **ОК**.
3. Открыть крышку прибора и установить пробирки с выпуклыми крышками в соответствующие ячейки, закрыть и завинтить крышку.

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

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

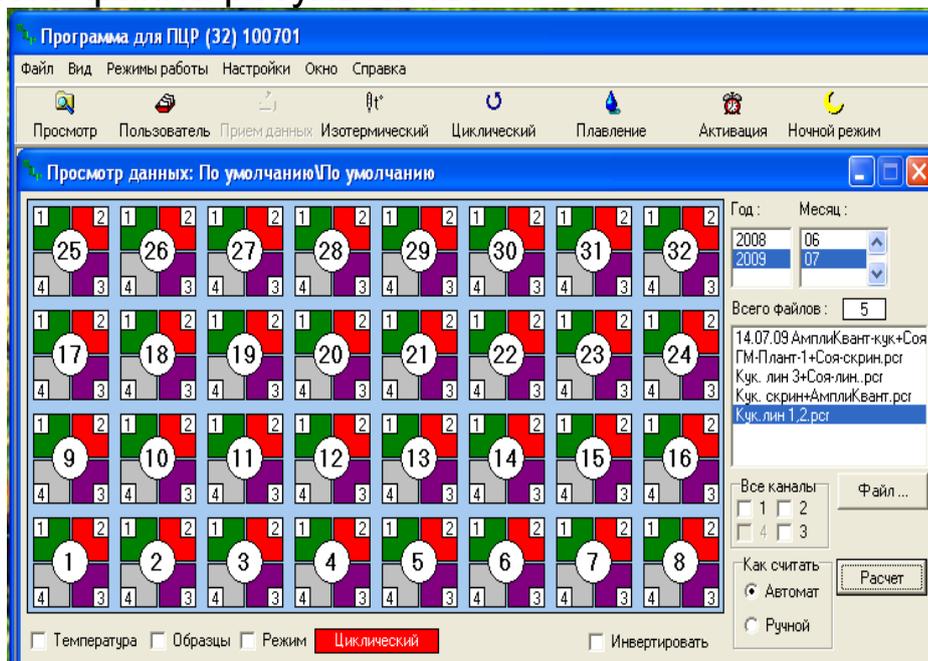
Анализ результатов

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



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

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



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

Заккрыть окно **Режим**.

4. В окне **Просмотр данных** выставить режим **Автомат**, если он не выбран, далее нажать кнопку **Расчет**. Появится окно с нормированными графиками и значениями пороговых циклов для всех ячеек по всем использованным каналам детекции. Для перехода на другую страницу нажать на кнопку с цифрой (соответствующей номеру первой показываемой в списке образцов ячейки) в верхнем правом углу окна.

