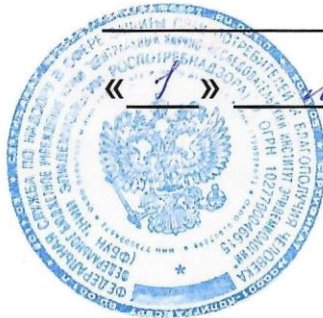


«УТВЕРЖДАЮ»

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


В.Г. Акимкин

_____ 2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиКвант ГМ кукуруза-NOS-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

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	10
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	11
СОСТАВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	14
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	14
А. Подготовка проб для проведения амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов	15
В. Интерпретация результатов	15
Г. Расчет относительного количества ГМ кукурузы с использованием электронного калькулятора «ГМИ-квант» (вариант NOS) в формате Microsoft® Excel.....	17
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:

ГМ	- генетически модифицированный
ГМО	- генетически модифицированные организмы
ГМИ	- генетически модифицированные ингредиенты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
СанПиН	- санитарные правила и нормы
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»
IRMM	- Institute for Reference Materials and Measurements (Институт контрольных материалов и измерений Европейского союза)
RSDr	- relative standard deviation for repeatability (относительное стандартное отклонение повторяемости)
RSD _R	- relative standard deviation for reproducibility (относительное стандартное отклонение воспроизводимости)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиКвант ГМ кукуруза-NOS-FL, далее – набор реагентов, не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для определения доли (%) ДНК генномодифицированной кукурузы от общего количества ДНК кукурузы в продуктах питания, кормах для животных и растительном сырье методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

Набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения в исследуемых образцах ДНК кукурузы и T-NOS, с помощью набора реагентов АмплиСенс® ГМ кукуруза-FL производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Набор реагентов позволяет количественно определять ГМ кукурузу линий, в геноме которых присутствует

терминатор T-NOS, например, GA-21, Event 3272 и MIR604 (производство Syngenta Seeds, Inc.). Поскольку ГМО, иные чем кукуруза, могут содержать T-NOS, метод пригоден для количественного определения ДНК ГМ кукурузы в отсутствие других ГМО.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала и одновременной амплификации участков ДНК кукурузы и T-NOS с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Эндогенный контроль (ген, специфичный как для трансгенной, так и нетрансгенной кукурузы) позволяет определять присутствие ДНК кукурузы в исследуемом образце и контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца.

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

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

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

Таблица 1

Канал для флуорофора	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК кукурузы	ДНК T-NOS

Относительное количество ГМ кукурузы определяют с помощью калибровочной прямой, для построения которой при

каждой постановке анализа тестируют калибровочные стандарты. Набор реагентов АмплиКвант ГМ кукуруза-NOS-FL комплектуется калибровочными стандартами, представляющими собой препараты ДНК с соотношением последовательностей T-NOS и ЭК кукурузы, соответствующим содержанию ГМИ 0,1; 1 и 5 %. Калибровочные стандарты необходимо тестировать в двух повторях.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 1 рассчитана на 55 реакций амплификации, включая калибровочные стандарты и контроли, и используется для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

<p>Аналитическая специфичность</p>	<p>Набор реагентов обнаруживает последовательности ДНК гена, специфичного для генома кукурузы, и ДНК T-NOS.</p> <p>Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между ДНК растений и T-NOS.</p> <p>Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК негенномодифицированных 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, DAS-68416-4, DAS-44406-6, DAS-81419-2, FG72, DP-356043, Syht0h2, <u>риса</u> LL62, <u>свеклы</u> H7-1, <u>картофеля</u> AM04-1020</p>
<p>Предел детекции (Limit of detection, LOD)</p>	<p>10³ копий ДНК/мл</p> <p>0,01% ГМИ</p>

Предел количественного определения (Limit of quantification, LOQ)	0,03% ГМИ
Диапазон количественной оценки (range of quantitation)	[0,03 – 10]% ГМИ
Точность (Trueness)	Систематическая погрешность измерения не более $\pm 25\%$ для всех точек диапазона количественной оценки
Повторяемость (repeatability)¹	RSD _r не более 25% для всех значений % ГМИ в пределах диапазона количественной оценки
Воспроизводимость (reproducibility)²	RSD _R менее 25% для всех значений % ГМИ в пределах диапазона количественной оценки

Набор реагентов разработан в соответствии с требованиями ISO 21569:2005, ISO 21570:2005 (ГОСТ Р 53244-2008), 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 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 «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%.

¹ оценивается с помощью относительного стандартного отклонения повторяемости, RSD_r

² оценивается с помощью относительного стандартного отклонения воспроизводимости, RSD_R

- 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.
- 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 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, упаковку³, 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 стерильные инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы).
3. Фарфоровая ступка с пестиком или гомогенизатор.
4. Измельчитель/мельница, или блендер.
5. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
6. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200, 1000 и 5000 мкл.
8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
9. Автоматические дозаторы переменного объема.
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

12. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

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

Аmplификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

15. 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 или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.

16. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 1000 мкл.

17. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.

18. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

19. Центрифуга-вортекс.

20. Автоматические дозаторы переменного объема.

21. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)) и другие, рекомендованные Изготовителем).

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

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

24. 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 проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, содержащие последовательность ДНК кукурузы, терминатора T-NOS.

Материалом для исследования служат:

- зерна кукурузы, кукурузная крупа и мука, концентрат кукурузного белка;
- каши и другие смеси круп, содержащие кукурузную крупу;
- кукурузные хлопья, чипсы и другие изделия, содержащие кукурузную муку;
- биодобавки, содержащие кукурузные компоненты;
- 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», 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, 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. Суспензии и продукты жидкой консистенции отбирают для экстракции в объеме 100 мкл.

Каждый образец рекомендуется отбирать на экстракцию и тестировать в двух повторах.

ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК генетически модифицированной кукурузы с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент		Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-NOS		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-NOS 1 %		Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–		Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Калибровочные стандарты	Кст ГМ кукуруза-NOS 0,1 %	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	5 пробирок
	Кст ГМ кукуруза-NOS 1 %	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	5 пробирок
	Кст ГМ кукуруза-NOS 5 %	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	5 пробирок
ОКО		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

Электронный калькулятор на базе Microsoft® Excel «ГМИ-квант» (вариант NOS) – на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

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.

Детальная информация по его использованию изложена в инструкции по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из биологического материала ДНК-сорб-С-М.

Каждый исследуемый образец рекомендуется тестировать в двух повторах. В качестве отрицательного контроля экстракции используют ОКО.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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 проб для проведения амплификации

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

1. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL ГМ кукуруза-NOS. Перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке:
 - 10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-FL ГМ кукуруза-NOS;
 - 5*(N+1) мкл ПЦР-буфера-С;
 - 0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF).
3. Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки 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) **калибровочный стандарт 0,1%** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл Кст ГМ кукуруза-NOS 0,1 %**.
- б) **калибровочный стандарт 1%** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл Кст ГМ кукуруза-NOS 1 %**.
- в) **калибровочный стандарт 5%** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл Кст ГМ кукуруза-NOS 5 %**.
- г) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.
- д) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ГМ кукуруза-NOS 1 %**.
- е) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

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

Порядок работы с помощью приборов **Rotor-Gene 6000** (Corbett Research, Австралия) и **Rotor-Gene Q** (QIAGEN, 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 приборов **«АНК-16»**, **«АНК-32»** (ЗАО «Синтол», Россия) смотрите в **Приложении 4**.

В. Интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 2

Канал для флуорофора	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК кукурузы	ДНК T-NOS

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов.

Результаты для контролей этапа амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 3.

Таблица 3

Результаты для контролей ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)	
		JOE	ROX
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 27	≤ 33

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

Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) или превышает 35 значение порогового цикла по каналу JOE. В этом случае требуется повторное проведение анализа данной пробы, начиная с экстракции ДНК. При этом экстракция проводится с добавлением экзогенного 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.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров JOE и ROX (см. табл. 3) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов образцов, в которых не обнаружена ДНК-мишень, соответствующая данному каналу. Необходимо повторить амплификацию и детекцию таких образцов.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 3) определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов образцов, в которых обнаружена ДНК-мишень, соответствующая данному каналу. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

Г. Расчет относительного количества ГМ кукурузы с использованием электронного калькулятора «ГМИ-квант» (вариант NOS) в формате Microsoft® Excel

Значения пороговых циклов C_t анализируются с помощью электронного калькулятора «ГМИ-квант» (вариант NOS). В соответствии с этими значениями автоматически происходит построение калибровочной прямой и расчет относительного количества ГМ кукурузы. Калибровочная прямая строится на основании заданных концентраций калибровочных стандартов и полученных средних значений разницы пороговых циклов (среднее ΔC_t) между ДНК Т-NOS и ДНК кукурузы для двух повторов каждого калибровочного стандарта.

Выполнение автоматической обработки результатов:

1. Открыть файл *ГМИ-квант_шаблон*.

ВНИМАНИЕ! Для работы с файлом *ГМИ-квант_шаблон* должны быть включены макросы *Microsoft Excel*.

2. Сохранить файл под другим именем.
3. Перейти на лист *Экспорт*.
4. Перенести названия образцов в столбец *Name* полей *ROX* и *JOE*.
5. Перенести значения C_t для Т-NOS в столбец C_t поля *ROX*.

6. Перенести значения **Ct** для ДНК кукурузы в столбец **Ct** поля **JOE**.
7. Нажать кнопку **Обновить данные**. Для исправления введенных данных, изменить их в ячейке и нажать кнопку **Обновить данные**.

Результат расчета концентрации ГМО считается достоверным, если:

1. Коэффициент корреляции (R^2), рассчитанный электронным калькулятором «ГМИ-квант» (вариант NOS), **более 0,97**.
2. Значения, рассчитанные для **К+ ГМ кукуруза-NOS 1%** и **калибровочных стандартов**, укладываются в следующие диапазоны:

Кст 0,1 %: $0,1 \pm 0,025$ %;

Кст 1 % и К+ ГМ кукуруза-NOS 1 %: $1 \pm 0,25$ %;

Кст 5 %: $5 \pm 1,25$ %.

Таблица 4

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
Рассчитанное значение % ГМИ больше, чем 10%	Содержание ГМ кукурузы более 10%
Рассчитанное значение % ГМИ находится в пределах диапазона количественной оценки набора реагентов	Содержание ГМ кукурузы X,XX%
Рассчитанное значение % ГМИ меньше, чем 0,03%	Содержание ГМ кукурузы менее 0,03%

Возможные ошибки:

1. Коэффициент корреляции (R^2), рассчитанный электронным калькулятором «ГМИ-квант», **менее 0,97**. Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.
2. Значения, рассчитанные для **К+ ГМ кукуруза-NOS 1 %** и **калибровочных стандартов**, не укладываются в указанные выше диапазоны. Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа амплификации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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

Хранение.

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

- часть 1 (К+ ГМ кукуруза-NOS 1 %, К–, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-NOS, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфер-С, Кст ГМ кукуруза-NOS 0,1 %, Кст ГМ кукуруза-NOS 1 %, Кст ГМ кукуруза-NOS 5 %) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ГМ кукуруза-NOS хранить в защищенном от света месте.

Температура хранения вскрытых реагентов соответствует температуре хранения, указанной на этикетках для невскрытых реагентов.

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

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** 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	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/Циклирование	95	10 с	–	40
	59	60 с	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. детек-мых,** пометить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции.** Для используемых каналов ROX/Orange и JOE/Yellow установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5FI** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10FI.** 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 эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы, калибровочные стандарты и контроли обозначить как **Unknown/Образец.** Стандартам

Кст 0,1 %, **Кст 1 %** и **Кст 5 %** присвоить имена **0,1%**, **1%** и **5%**, соответственно.

Анализ результатов

Анализ результатов по каналу ROX/Orange:

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, 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**, **Slope Correct/Коррек. уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить **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 каналу JOE/Yellow:

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

Threshold/Порог.

4. В меню основного окна ***Quantitation analysis/Количественный анализ*** 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 ***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.***

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
2. Открыть программу iCycler.
3. 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 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 **JOE** и **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 **JOE-530** и **ROX-575**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне ***Plate Setup Filename*** (с расширением

.pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее **Plate Setup**, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

5. Задать программу амплификации:

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	42
	59	60 с	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 3 – 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. Стандартам **Кст 0,1 %**, **Кст 1 %** и **Кст 5 %** присвоить имена **0,1%**, **1%** и **5%**, соответственно.
 8. 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 **JOE** и **ROX**. Результаты обрабатывать для каждого канала по отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.
3. В режиме анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию) поочередно для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне **5-10 %** от максимального значения флуоресцентного сигнала образца

K+. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

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

Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор, запустить программу RealTime_PCR v.7.3 или выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста – например, «**Кукуруза-NOS-количество**» – и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – **качественный** (так как количественный расчёт производится в отдельной программе).
 - **Метод** – **Пороговый (Ct)**.
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль +, контроль –**.
 - **Контроли: положительный (К+) – 1, отрицательный (К-) – 1**.
 - **Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл**.
 - **Флуорофоры – Rox – специфика; Hex – ВК**.
 - 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	–	40
	59	60 с	Hex, Rox	

4. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**
5. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**Кукуруза-NOS-**

- количество»**, указать количество образцов и нажать **ОК**.
6. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Стандартам **Кст 0,1 %**, **Кст 1 %** и **Кст 5 %** присвоить имена **0,1%**, **1%** и **5%**, соответственно. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
 7. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации** указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
 8. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

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

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

Анализ результатов

Анализ результатов амплификации участка терминатора NOS и ДНК кукурузы (каналы Rox и Hex, соответственно).

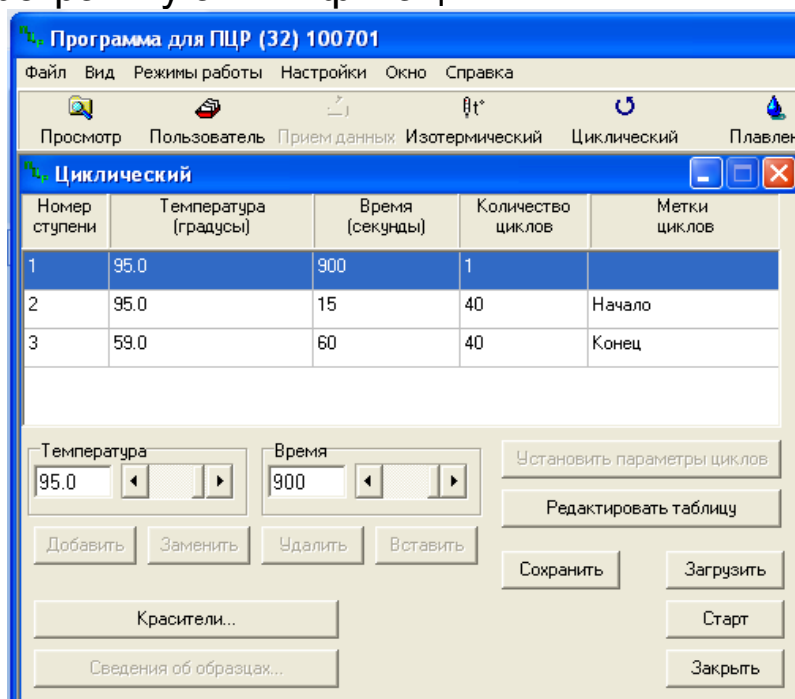
1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс для версии программы v.7.5. и выше)**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Кнопка **Фитирование** (сглаживание кривых) должна быть **включена**.
5. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить критерии положительных результатов по нижней и верхней границам **10 %**. Опцию **Нормализация данных не использовать** (галочка напротив соответствующей графы должна отсутствовать). Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В

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

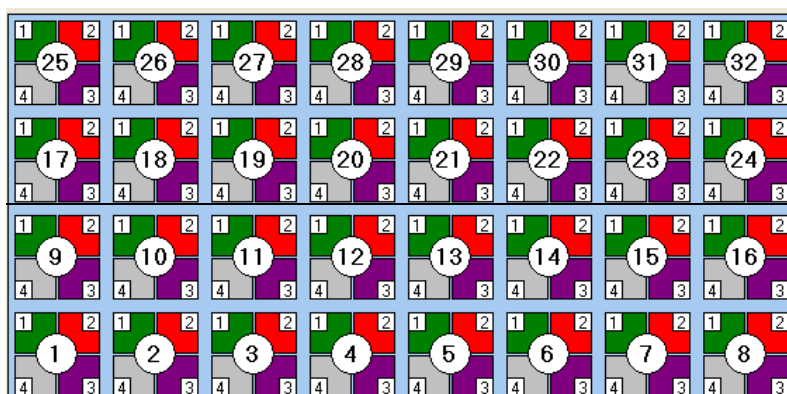


3. Температура и время каждого шага/ступени амплификации устанавливаются в нижней половине окна, с помощью клавиатуры или бегунков. После установки каждого значения необходимо нажать кнопку **Заменить**. Для изменения количества шагов используются кнопки **Добавить**, **Удалить** и **Вставить**.
4. Для 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 (**ROX, R6G**), затем нажать **ОК**.
6. Для сохранения программы амплификации в окне **Циклический** выбрать **Сохранить**. В открывшемся окне выбрать **Создать пользователя** или выбрать пользователя из списка в левом верхнем углу. При создании пользователя задать имя пользователя и нажать **ОК**. Отметив в списке имя пользователя, нажать **Сохранить**. В появившемся окне ввести название программы (метода) – например, «**Кукуруза-NOS-количество**» – 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). Стандартам **Кст 0,1 %**, **Кст 1 %** и **Кст 5 %** присвоить имена **0,1%**, **1%** и **5%**, соответственно. 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. Ячейки нумеруются следующим образом (вид сверху):



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

Анализ результатов амплификации участка терминатора T-NOS и ДНК кукурузы (каналы ROX и R6G, соответственно).

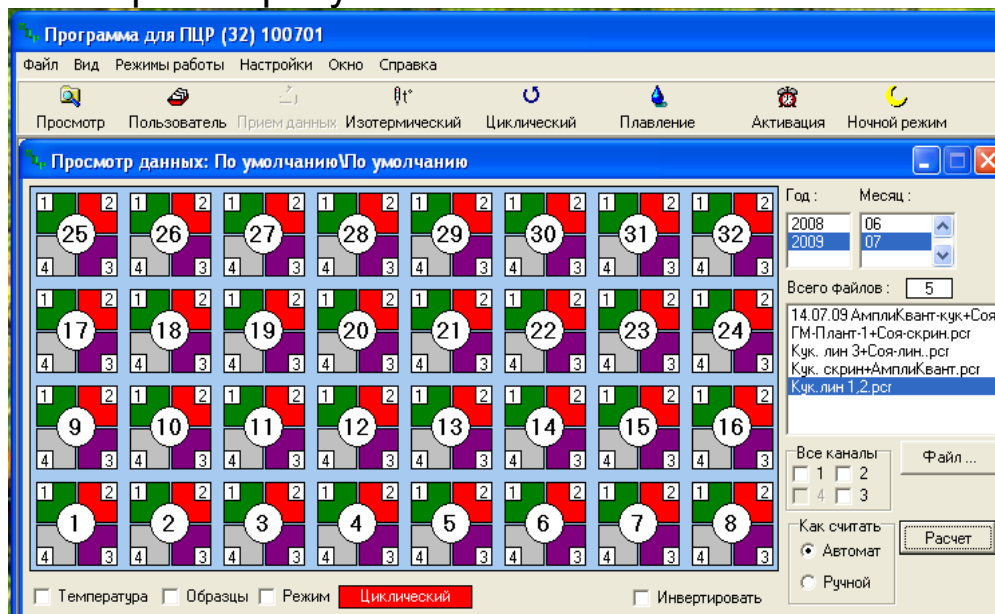
1. В меню **Настройки** выбрать пункт **Расчет**. В открывшемся окне установить следующие значения параметров.

Параметр	Канал 1	Канал 2	Канал 3	Канал 4
Отношение максимум/минимум больше, чем :	1.300	1.300	1.300	1.300
Отношение между соседними точками меньше	2.100	2.100	2.100	2.100
Абсолютный рост по амплитуде больше, чем :	50	100	50	50
Порог :	0.000			
Расчет по последним точкам				
Отношение максимум/минимум больше, чем	1.100	1.100	1.100	1.100
Уровень порогового цикла:	0.000		<input type="checkbox"/> Включить в расчет	
Число точек на полке:	3			

Buttons: Применить и Выйти, ОК, Отмена

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

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



- В окне **Просмотр данных** отметить галочкой пункт **Режим**. В появившемся окне в пункте **Номер ступени для расчета** выставить значение **3** (если выставлено другое значение). Закрывать окно **Режим**.
- В окне **Просмотр данных** выставить режим **Автомат**, если он не выбран, далее нажать кнопку **Расчет**. Появится окно с нормированными графиками и значениями пороговых циклов для всех ячеек по всем использованным каналам детекции. Для перехода на другую страницу нажать на кнопку с цифрой (соответствующей номеру первой показываемой в списке образцов ячейки) в верхнем правом углу окна. Для печати или сохранения результатов в формате текстового документа (TXT) нажать соответствующие кнопки в верхнем левом углу.