




Набор реагентов для выявления ДНК рыб семейства лососёвых *Oncorhynchus gorbuscha* (горбуша), *Oncorhynchus keta* (кета), *Oncorhynchus nerka* (нерка) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции ПЦР в режиме «реального времени»

АмплиПрайм® Горбуша / Кета / Нерка

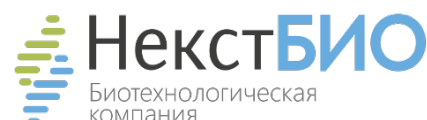
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2040-1Z  96

Только для ветеринарных и других
немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	4
2.1. Состав и комплектность.....	4
2.2. Принцип метода.....	5
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	6
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ.....	7
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	8
6.1. Взятие исследуемого материала.....	8
6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК.....	8
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.....	9
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов.....	9
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	11
7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала.....	11
7.2. Подготовка материала к исследованию.....	11
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	13
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала.....	13
8.2. Подготовка реагентов для амплификации.....	13
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции.....	14
8.4. Анализ и обработка результатов.....	15
8.5. Используемые настройки амплификаторов.....	15
8.6. Интерпретация результатов.....	16
8.7. Возможные ошибки.....	17
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	18
9.1. Предел обнаружения.....	18
9.2. Аналитическая специфичность.....	18
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.....	19
10.1. Срок годности.....	19
10.2. Транспортирование.....	19
10.3. Хранение.....	19
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	19
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
К-	отрицательный контроль ПЦР
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКО	отрицательный контрольный образец, отрицательный контроль экстракции
ПК	положительный контроль
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК рыб семейства лососёвых *Oncorhynchus gorbuscha* (горбуша), *Oncorhynchus keta* (кета), *Oncorhynchus nerka* (нерка) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции ПЦР в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Горбуша/Кета/Нерка».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Горбуша/Кета/Нерка», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Горбуша / Кета / Нерка» предназначен для выявления ДНК рыб семейства лососевых: горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*), кеты (*Oncorhynchus keta*) и нерки (*Oncorhynchus nerka*) в биологическом материале (цельная кровь, плазма, сыворотка крови, внутренние органы, части туши), полуфабрикатах рыбного происхождения, в продуктах питания, кормах для животных методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор реагентов используется в лабораториях, осуществляющих контроль качества продуктов питания и кормов для животных, а также ветеринарно-санитарную экспертизу продуктов убоя животных.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Набор выпускается в единой форме. Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор используется для ручной методики выделения НК или совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь Горбуша / Кета / Нерка	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ с дУТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Горбуша / Кета / Нерка	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов «АмплиПрайм® Горбуша / Кета / Нерка»	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Вкладыш для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В)¹ и одновременной амплификации видоспецифических участков митохондриальной ДНК рыб семейства лососёвых *Oncorhynchus gorbuscha* (горбуша), *Oncorhynchus keta* (кета), *Oncorhynchus nerka* (нерка), а также искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО В с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО В позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

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 (зонды), 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 трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится 4 реакции – амплификация видоспецифических участков митохондриальной ДНК рыб семейства лососёвых *Oncorhynchus gorbuscha* (горбуша), *Oncorhynchus keta* (кета) и *Oncorhynchus nerka* (нерка), а также амплификация последовательности ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по 4 различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

¹ ВКО В входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции нуклеиновых кислот из исследуемого материала.

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ²	ROX	Sy5
ДНК-мишень	ДНК рыб <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> (горбуша)	ДНК рыб <i>Oncorhynchus keta</i> (кета)	ДНК рыб <i>Oncorhynchus nerka</i> (нерка)	ВКО В
Область амплификации	мтДНК	мтДНК	мтДНК	искусственно синтезированная последовательность

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио» каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® Горбуша/Кета/Нерка» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор «АмплиПрайм® Горбуша/Кета/Нерка» применяется только для ветеринарных и других немедицинских целей.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов материалов может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® Горбуша / Кета / Нерка» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – «ВКО В». Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Анализ пищевых продуктов с истекшим сроком годности или при неправильном хранении может привести к получению невалидных результатов. Пищевые продукты в процессе транспортировки хранить в рекомендованных производителем условиях.

4.6. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

² Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования. ПЦР-исследования должны проводиться с соблюдением требований методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПин 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения при проведении ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор 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.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1% и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Вакуумные пробирки для забора крови с ЭДТА.

6.1.2. Вакуумные пробирки для забора крови без антикоагулянта.

6.1.3. Вакуумные пробирки для забора крови с активатором свертывания и/или гелем.

6.1.4. Иглы стерильные двусторонние трубчатые с вакуумными пробирками.

6.1.5. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл.

6.1.6. Пакеты и емкости для отбора, транспортирования и хранения полуфабрикатов, продуктов питания, однократного применения (Zip-Lock пакеты).

6.1.7. Стерильные салфетки.

6.1.8. Антисептик.

6.1.9. Сухие стерильные зонды с ватными тампонами.

6.1.10. Скальпель, ножницы.

6.1.11. Пинцет, шпатель.

6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

6.2.1. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 2 мл.

6.2.2. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5, 15 или 50 мл.

6.2.3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.4. Центрифуга для полипропиленовых пробирок типа «Falcon» не менее 2 000 g.

6.2.5. Центрифуга-вортекс.

6.2.6. Фарфоровые ступки и песты или гомогенизатор.

6.2.7. Металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцет и т.п.).

6.2.8. Фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор.

6.2.9. Мембранные фильтры с диаметром пор 450 мкм.

6.2.10. Ватно-марлевые фильтры.

6.2.11. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 10 до 1000 мкл.

6.2.12. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.13. Стеклоянная или полипропиленовая воронка.

6.2.14. Аналитические или прецизионные весы.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм ВЕТ» («Формат 96») производства ООО «НекстБио», Россия или «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия, или любой другой набор, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (цельная кровь, плазма, сыворотка крови, внутренние органы, части туши), полуфабрикатов рыбного происхождения, продуктов питания и кормов для животных методом ПЦР с гибридаизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации;

- набор не содержит реактивов животного происхождения;

- состав набора включает реагенты ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО В (внутренний контрольный образец);

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;

- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для экстракции НК других производителей, необходимо дополнительно приобрести набор реагентов «МагноПрайм ВЕТ» формы выпуска «Формат Контроли». Реагент ВКО В следует добавлять во все исследуемые образцы, а также в отрицательный контрольный образец (ОКО).

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов:

- плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,6 мл или 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;

- 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 – для проведения ПЦР при использовании амплификатора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

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

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя (не является обязательным требованием!).

6.4.8. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 с характеристиками, указанными в таблице 4:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4$ °C;
- скорость нагрева не менее 2 °C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/сек.

6.4.9. Холодильник с морозильной камерой от минус 24 °C до минус 16 °C.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- биологический материал (цельная кровь, плазма, сыворотка крови, внутренние органы, части туши);
- полуфабрикаты рыбного происхождения;
- продукты питания;
- корма и кормовые добавки для животных, содержащие компоненты животного происхождения.

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с ГОСТ 31719-2012 «Продукты пищевые и корма. Экспресс – метод определения сырьевого состава (молекулярный)». Отбор, транспортирование и хранение исследуемых образцов следует проводить в соответствии с требованиями ГОСТов на соответствующий вид продукции.

Отбор образцов продукции проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов. Транспортируют образцы в одноразовых стерильных контейнерах.

При отборе проб необходимо соблюдать меры по предотвращению контаминации образцов. Для этого отбор проб проводят в перчатках, а инструменты, применяемые для отбора и измельчения материала, используют однократно или обрабатывают моющими средствами и стерилизуют в пламени спиртовки или газовой горелки при переходе от одной пробы к другой с использованием одноразовых герметично закрывающихся пластиковых контейнеров или пакетов.

Каждую отобранную пробу маркируют этикетками с указанием наименования продукта, предприятия-изготовителя, номера партии, даты отбора проб, цели исследования, подписей лиц, отбравших пробу.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

Для каждого животного при взятии материала используют отдельные стерильные инструменты.

Кровь отбирают в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА). Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Кровь берут из хвостовой вены. При взятии крови отловленную рыбу следует обернуть стерильной салфеткой, место пункции обработать антисептиком. Размер иглы подбирают в зависимости от размера рыбы.

После пункции вены следует взять необходимое количество крови, затем иглу извлечь, место пункции обработать антисептиком, рыбу отпустить.

Сыворотку крови отбирают в вакуумные пробирки с активатором свертывания и/или гелем из хвостовой вены.

После отбора образца пробирку не переворачивают.

Образцы мышечной ткани рыбы отбирают из середины тушки пинцетом или шпателем, предварительно сделав разрез ножницами или скальпелем и помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Тканевый (аутопсийный) материал (фрагменты тканей и органов) помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Полуфабрикаты рыбного происхождения, продукты питания, корма для животных отбирают и транспортируют согласно соответствующему ГОСТ.

Образцы исследуемого материала (за исключением цельной крови) хранят при следующих условиях:

- при температуре 2 – 8 °С – в течение 1 суток (цельную кровь допускается хранить при данной температуре в течение 7 суток);
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание всех образцов.

Несоблюдение требований может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.2. Подготовка материала к исследованию

Кровь используется без предварительной подготовки.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10 мин с ускорением 10 000 g. После этого переносят плазму с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 - 2,0 мл.

Сыворотку крови получают отстаиванием пробирки с цельной кровью при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Переносят сыворотку одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовые пробирки объемом 1,5 мл.

Образцы мышечной ткани рыбы отбирают из середины тушки пинцетом или шпателем, предварительно сделав разрез ножницами или скальпелем.

Пробы органов, плавников, продуктов рыбного происхождения и продуктов питания гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатно-солевом буфере, или воде первого типа. Суспензию переносят в пробирку (объем пробирки зависит от объема приготовленной суспензии) и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение гомогенатов при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 месяца.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории³:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75%.

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)⁴ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО В)⁴.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца⁵ – **100 мкл** в пробирку для исследуемых образцов;
- объем реагента ВКО В⁴ – **10 мкл** в каждую экстрагируемую пробу;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **50 мкл** (при использовании набора для экстракции НК «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ») или **100 мкл** (при использовании набора «МагноПрайм ВЕТ» или **50 – 100 мкл** (при использовании другого набора для экстракции согласно инструкции к нему).

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Горбуша / Кета / Нерка** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Горбуша / Кета / Нерка	10,0*(N+1)	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	5,0*(N+1)	

³ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁴ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

⁵ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Горбуша / Кета / Нерка** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) **положительный контроль ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** реагента **ПКО Горбуша / Кета / Нерка**.

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

в) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** реагента **К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения «Единой» программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G ⁶ , ROX, Cy5	

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

⁶ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание: рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager версии 2.0 или выше (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых (см. п. 8.5.) зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 4-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁷	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК горбуши (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	ДНК кеты (<i>Oncorhynchus keta</i>)	ДНК нерки (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	ДНК ВКО В

8.5. Используемые настройки амплификаторов

Рекомендуемые настройки для приборов указаны в таблицах 8 - 10.

Таблица 8

Рекомендуемые настройки для приборов роторного типа

Канал	Опт.уровня сигнала	Порог	Устранение выбросов	Динамический фон	Коррект.уклона	Исключить циклы
FAM/Green	от 5 FI до 15 FI	0,02	10 – 15 %	включен	включена	от 1 до 10
R6G/Yellow	от 5 FI до 15 FI	0,02	10 – 15 %	включен	включена	от 1 до 10
ROX/Orange	от 5 FI до 15 FI	0,03	10 – 15 %	включен	включена	от 1 до 10
Cy5/Red	от 5 FI до 15 FI	0,03	10 – 15 %	включен	включена	от 1 до 10

При запуске прибора роторного типа в окне «Автооптимизация уровня сигнала» активировать функцию «Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции».

⁷ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

При использовании амплификатора «CFX96» следует применять настройки согласно таблице 9.

Таблица 9

Настройки для прибора «CFX96»

Параметр	Шаг этапа циклирования	Скорость нагревания/охлаждения
Step Options	95 °C	2,5 °C/сек
	60 °C	2,5 °C/сек

Анализ результатов для прибора «CFX96».

Провести анализ результатов по каналам **FAM, R6G, ROX** и **Cy5** (для каждого канала по отдельности), активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.

Для настройки базовой линии выберите меню **Settings** (Настройки), затем последовательно нажмите кнопки **Base Line Subtracted Curve Fit** (Подбор кривой по точкам с вычетом базовой линии) и **Apply Fluorescence Drift Correction** (Применить коррекцию смещения флуоресценции). В меню **Threshold Cycle Calculation** (Пороговый уровень базовой линии) выбрать режим ручной установки пороговой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** (Циклы базовой линии) выбрать **Auto Calculated** (Рассчитан автоматически), а в подменю **Single Threshold** (Единый пороговый уровень) выбрать **User Defined** (Определен пользователем) и применить настройки, указанные в таблице 10.

Таблица 10

Рекомендуемые настройки для приборов планшетного типа

Канал	Threshold / Порог	Исключить циклы
FAM	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для ПКО Горбуша / Кета / Нерка в последнем цикле амплификации	от 1 до 10
R6G		
ROX		
Cy5	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для ОКО в последнем цикле амплификации	

8.6. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 12. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager версии 2.0 или выше (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 11 - 12.

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Определено Ct ≤ 34,0 / ≤ 38,0
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
ПКО Горбуша / Кета / Нерка (положительный контроль)	Определено Ct ≤ 29,0 / ≤ 31,0	Определено Ct ≤ 30,0 / ≤ 33,0	Определено Ct ≤ 32,5 / ≤ 36,0	Отсутствует

Таблица 12

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX определены > 40 или отсутствуют , при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено .	ДНК горбуши и/или кеты и/или нерки не обнаружена
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX определено ≤ 40 . При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	ДНК горбуши и /или ДНК кеты и /или ДНК нерки обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует , при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX определены > 40 или отсутствуют .	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

8.7. Возможные ошибки

8.7.1. Для отрицательного контрольного образца (ОКО) по каналу для флуорофора FAM, R6G или ROX определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.7.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофора FAM, R6G, ROX или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

8.7.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.7.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM, R6G, ROX и Cy5, что свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку и исследование образца.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Горбуша/Кета/Нерка» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 13). Значения характеристики, указанные в таблице 13, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 13

Предел обнаружения набора

ДНК-мишень	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл
ДНК <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> (горбуша)	1,0x10 ³
ДНК <i>Oncorhynchus keta</i> (кета)	1,0x10 ³
ДНК <i>Oncorhynchus nerka</i> (нерка)	1,0x10 ³

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® Горбуша/Кета/Нерка» обнаруживает фрагменты ДНК *Oncorhynchus gorbuscha* (горбуши), *Oncorhynchus keta* (кеты) и *Oncorhynchus nerka* (нерки).

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК рыб, указанных в таблице 14. ДНК рыб в концентрации не менее 1,0x10⁶ копий/мл вносили в образцы биоматериала, не содержащие ДНК *Oncorhynchus gorbuscha* (горбуша), ДНК *Oncorhynchus keta* (кета) и ДНК *Oncorhynchus nerka* (нерка).

Таблица 14

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Исследованные организмы	
Кижуч (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Кумжа (<i>Salmo trutta</i>)
Нельма (<i>Stenodus leucichthys nelma</i>)	Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)
Обыкновенный сиг (<i>Coregonus lavaretus</i>)	Обыкновенный таймень (<i>Hucho taimen</i>)
Сима (<i>Oncorhynchus masou</i>)	Чавыча (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)
Арктический голец (<i>Salvelinus alpinus</i>)	Сибирский хариус (<i>Thymallus arctic</i>)

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

Допускается транспортирование не более 3 суток при температуре от 8 до 25 °С.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси Горбуша / Кета / Нерка и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® Горбуша / Кета / Нерка» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

REF

Номер по каталогу



Изготовитель

LOT

Код партии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению