




Набор реагентов для выявления ДНК генетически модифицированных организмов растительного происхождения в кормах, сырье и продуктах питания методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ГМО Растение»

## АмплиПрайм® ГМО Растение

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**REF** G2118-1Z  96

Только для исследовательских  
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 .....	6
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ .....	8
6.1. Взятие исследуемого материала .....	8
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала .....	8
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов .....	8
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов .....	9
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ .....	10
7.1. Предварительная обработка .....	10
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	11
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала .....	11
8.2. Подготовка реагентов для амплификации .....	11
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции .....	12
8.4. Анализ и обработка результатов .....	13
8.5. Интерпретация результатов .....	13
8.6. Возможные ошибки .....	15
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА .....	16
9.1. Предел обнаружения .....	16
9.2. Аналитическая специфичность .....	16
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА .....	17
10.1. Срок годности .....	17
10.2. Транспортирование .....	17
10.3. Хранение .....	17
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....	17
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....	18

---

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

---

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ГМ	генно-модифицированный
ГМИ	генно-модифицированные источники
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
К-	отрицательный контроль ПЦР
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

---

## НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

---

Набор реагентов для выявления ДНК генетически модифицированных организмов растительного происхождения в кормах, сырье и продуктах питания методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ГМО Растение».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® ГМО Растение», а также сокращение Набор реагентов.

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® ГМО Растение» предназначен для выявления ДНК энхансера и промотора 35S Cauliflower mosaic virus (L35SCaMV и p35S (p35SCaMV)), терминатора гена нопалин-синтазы *Agrobacterium tumefaciens* (tNOS), энхансера и промотора 35S Figwort mosaic virus (L35S-CMoVb и pCMoVb (pFMV)), ДНК вируса мозаики цветной капусты Cauliflower mosaic virus (CaMV) в сырье растительного происхождения (образцы семян, круп, растительные образцы, отобранные из окружающей среды, вегетативные части растений), продуктах питания и кормах, содержащих компоненты растительного происхождения (заменители молока, печенье, каши, хлопья, шрот, текстураты и т.п.), в продуктах питания, полуфабрикатах, сырье и кормах животного происхождения (кормовые добавки, комбикорма, мясокостная мука, консервы и т.п.) для выявления фальсификаций сырья, пищевой продукции и детекции несанкционированных примесей в кормах методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Набор реагентов предназначен для использования в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования продуктов питания и кормов для животных, содержащих компоненты растительного происхождения, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

## 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 методом ПЦР с гибридизационно-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 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 ГМО Растение	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 Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО ГМО Растение	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® ГМО Растение»	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: <a href="http://www.nextbio.ru">www.nextbio.ru</a>	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде на официальном сайте Производителя: <a href="http://www.nextbio.ru">www.nextbio.ru</a>	-
Вкладыш для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

## 2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной амплификации участков ДНК промоторов р35SCamV и рFMV, терминатора tNOS, ДНК вируса CamV, эндогенного контроля ДНК растений и экзогенного контроля искусственно синтезированной последовательности ДНК (ВКО-FL)<sup>1</sup> при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды 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 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 в одной пробирке одновременно амплифицируются участки ДНК промоторов р35SCamV и рFMV, терминатора tNOS, ДНК вируса CamV, эндогенного контроля ДНК растений и экзогенного контроля искусственно синтезированной последовательности ДНК (ВКО-FL). Результаты амплификации регистрируются по пяти каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

<sup>1</sup> ВКО-FL входит в состав наборов реагентов, рекомендованных Производителем для экстракции нуклеиновых кислот из исследуемого материала.

### Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G <sup>2</sup>	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ВКО-FL	tNOS	p35SCamV и / или pFMV	CamV	ДНК растений
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	терминатор гена нопалин-синтазы	промотор гена 35S рРНК CamV и / или pFMV	ген CamV P3	ген NAD1

## 3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

## 4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор «АмплиПрайм® ГМО Растение» применяется только для исследовательских и других немедицинских целей.

4.2. Набор предназначен для анализа образцов ДНК, экстрагированных из исследуемого материала, приведенного в разделе «Исследуемый материал». Исследование других видов материала 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. Анализ пищевых продуктов с истекшим сроком годности, или хранившихся с нарушением требуемых условий, может показать невалидные результаты. Пищевые продукты в процессе транспортировки необходимо хранить в рекомендованных производителем условиях.

4.5. Применение набора возможно только персоналом, обученным правилам работы в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования.

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования с соблюдением требований методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и ГОСТ Р 53214-2008 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения».

<sup>2</sup> Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

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

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

6.1.4. Аналитические или прецизионные весы.

### **6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала**

6.2.1. Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 – 2,0 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 – 2,0 мл с ускорением не менее 10 000 g.

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

6.2.5. Фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.6. Ножницы.

6.2.7. Автоматические дозаторы переменного объема.

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

6.2.9. Вортекс.

6.2.10. Дистиллированная вода.

6.2.11. Анатомический пинцет.

### **6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов**

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм® ГМО» или «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия, либо любой другой рекомендованный производителем набор, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из сырья растительного происхождения (образцов семян, круп, растительных образцов, отобранных из окружающей среды, вегетативных частей растений), продуктов питания и кормов, содержащих компоненты растительного происхождения (заменители молока, печенье, каши, хлопья, шрот, текстураты и т.п.), из продуктов питания, полуфабрикатов, сырья и кормов животного происхождения (кормовые добавки, комбикорма, мясокостная мука, консервы и т.п.) для последующего исследования методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

- состав набора включает реагент ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО-FL (внутренний контрольный образец);

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 200 мкл;

- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

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:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 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 10 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. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции - в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

6.4.7. Автоматические дозаторы переменного объема.

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 и Cy5.5 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
Cy5.5	660	690	705	750

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

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °С.

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 пробы ДНК, экстрагированные из следующих образцов:

- сырье растительного происхождения (образцы семян, круп, растительные образцы, отобранные из окружающей среды, вегетативные части растений);
- продукты питания и корма, содержащие компоненты растительного происхождения (заменители молока, печенье, каши, хлопья, шрот, текстураты и т.п.);
- продукты питания, полуфабрикаты, сырье и корма животного происхождения (кормовые добавки, комбикорма, мясокостная мука, консервы и т.п.).

**ВНИМАНИЕ!** Перед началом работы следует ознакомиться с методическими указаниями МУ 2.3.2.1917-04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически-модифицированные аналоги». Отбор, транспортирование и хранение исследуемых образцов следует проводить в соответствии с требованиями ГОСТов на соответствующий вид продукции.

**ВНИМАНИЕ!** Продукты питания с истекшим сроком годности анализу не подлежат.

### 7.1. Предварительная обработка

**ВНИМАНИЕ!** Все исследуемые образцы должны пройти процедуру предварительной подготовки в соответствии с рекомендуемой ниже процедурой.

7.1.1. Исследуемые образцы массой не менее 100 мг растереть пестиком в ступке до однородного состояния.

Примечания:

1) Гомогенизацию образцов плотных продуктов рекомендуется проводить с использованием автоматических гомогенизаторов и сопутствующих расходных материалов.

2) Сухие, протравленные, обработанные репеллентами против птиц и грызунов семена и зерна рекомендуется замачивать в дистиллированной воде в течение суток.

3) Продукты с высоким содержанием сахаров, соли и специй рекомендуется обработать для удаления избытков углеводов и солей, способных повлиять на качество ПЦР, следующим образом: количество образцов, отобранное для гомогенизации, предварительно промыть дистиллированной водой 2-3 раза, каждый раз удаляя воду, оставшуюся плотную массу использовать для гомогенизации.

Допускается хранение гомогенатов согласно условиям, рекомендованным для хранения сырья или пищевого продукта.

7.1.2. К гомогенизированным образцам добавить Буфер Р<sup>3</sup> из расчета 1 мл Буфера Р на каждые 100 мг образца. В зависимости от консистенции образца продолжить гомогенизацию в ступке до получения однородной суспензии, либо тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе.

В чистые промаркированные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл отобрать 1,2 мл полученной суспензии и инкубировать 10 минут при 65 °С, перемешивая содержимое на вортексе каждые 2 минуты. Центрифугировать пробирки с исследуемыми образцами при 3 000 g<sup>4</sup> в течение 5 мин. Надосадочную жидкость, полученную после предварительной обработки образцов, используют для выделения ДНК согласно Инструкции к наборам реагентов «МагноПрайм® ГМО» и «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия.

<sup>3</sup> Реагент входит в состав набора «МагноПрайм® ГМО» и «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия.

<sup>4</sup> Для мини-центрифуг Eppendorf MiniSpin®/ MiniSpin® plus: 6500 обр/мин.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории<sup>5</sup>:

- 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**)<sup>6</sup> в одном повторе. При проведении экстракции ДНК, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (**ВКО-FL**)<sup>5</sup>.

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

- объем **исследуемого образца**<sup>7</sup> – **200 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента **ВКО-FL**<sup>5</sup> – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами;
- объем реагента **ОКО** – **100 мкл** в пробирку для **ОКО**;
- объем **реагента, используемого для элюции ДНК**, – **100 мкл** при использовании наборов для экстракции НК «МагноПрайм® ФИТО» и «МагноПрайм® ГМО» производства ООО «НекстБио», Россия, либо при использовании любого другого рекомендованного Производителем набора, соответствующего требованиям, указанным в п. 6.3. данной Инструкции.

### 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 ГМО Растение** 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 реакционной смеси**

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь ГМО Растение	<b>10,0*(N+1)</b>	<b>N</b> – количество амплифицируемых образцов ДНК, включая контроли
Буфер В	<b>5,0*(N+1)</b>	

<sup>5</sup> 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».

<sup>6</sup> Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

<sup>7</sup> Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью ГМО Растение** 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**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

**а) положительный контроль ПЦР (ПК)** – в одну пробирку для образца **ПК** внести **10 мкл** реагента **ПКО ГМО Растение**.

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

**в) отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку для образца **ОК** внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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, ROX, Cy5, Cy5.5	

**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 минут) для экономии времени.

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

**Примечание:** необходимо 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 (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, инструкции по применению набора и краткому руководству, прилагаемому к набору.

**ВНИМАНИЕ!** Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно краткому руководству, прилагаемому 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 зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по пяти каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

#### Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
Продукт амплификации	искусственно синтезированная последовательность	терминатор гена нопалин-синтазы	промотор гена 35S рPHK CamV и / или рFMV	ген CamV P3	ген NAD1

#### 8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

– вручную в соответствии с таблицей 9 и кратким руководством, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 8 и в кратком руководстве, прилагаемом к набору;

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (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 8 и 9 соответственно, и в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

## Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ПКО ГМО Растение (положительный контроль)	Отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного	Определено значение Ct не выше граничного	Определено значение Ct не выше граничного	Определено значение Ct не выше граничного
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение Ct не выше граничного <sup>8</sup>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 9

## Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значения Ct по каналам для флуорофоров R6G и / или ROX и / или Cy5 и / или Cy5.5 отсутствуют, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено выше граничного. Значение Ct по каналу для флуорофора ROX отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено, при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или Cy5.5 определены или отсутствуют.	<b>Невалидный!</b> Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного.	<b>ДНК растений не обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного.	<b>Результат недостоверный / сомнительный</b> Рекомендуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено или отсутствует.	<b>ДНК растений обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено.	<b>ДНК терминатора гена нопалин-синтазы (tNOS) обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора ROX определено, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено.	<b>ДНК промотора гена 35S рPHK CamV (p35SCamV) и / или рFMV обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора ROX и Cy5 определено, при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или Cy5.5 определено или отсутствует.	<b>ДНК вируса мозаики цветной капусты (CamV) обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено или отсутствует.	<b>ДНК вируса мозаики цветной капусты (CamV) не обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, значение Ct по каналу для флуорофора ROX отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено или отсутствует	<b>ДНК терминатора гена нопалин-синтазы (tNOS), ДНК промотора гена 35S рPHK CamV (p35SCamV) и / или рFMV не обнаружены</b>

<sup>8</sup> Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

**ВНИМАНИЕ!** Если значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 выше граничного, результаты амплификации любого из элементов трансгенных конструкций (p35S CamV, pFMV и tNOS) для исследуемого образца являются сомнительными. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование образца, начиная с этапа амплификации. В случае повторения сомнительного результата необходимо провести повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции.

## **8.6. Возможные ошибки**

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров R6G, ROX, Cy5 и / или Cy5.5 определены значения порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов другими образцами или продуктами амплификации 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.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 и / или Cy5.5 определены значения 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.

8.6.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM, 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<sup>9</sup>

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® ГМО Растение» был определен с использованием пробит-анализа с 95 %-ой доверительной вероятностью и составляет  $1,0 \times 10^3$  копий/мл (см. таблицу 10). Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 10

Предел обнаружения набора

ДНК-мишень	Предел обнаружения, копий/мл
p35SCamV	$1,0 \times 10^3$
pFMV	$1,0 \times 10^3$
tNOS	$1,0 \times 10^3$
ДНК вируса CamV	$1,0 \times 10^3$
ДНК растений	$1,0 \times 10^3$

### 9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает ДНК энхансера и промотора 35S Cauliflower mosaic virus (L35SCaMV и p35S (p35SCaMV)), терминатора гена нопалин-синтазы *Agrobacterium tumefaciens* (tNOS), энхансера и промотора 35S Figwort mosaic virus (L35S-CMoVb и pCMoVb (pFMV)), ДНК вируса мозаики цветной капусты Cauliflower mosaic virus (CamV).

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием образцов ДНК растений и животных, а также линий ГМ-растений. В результате тестирования образцов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

<sup>9</sup> Предел обнаружения – 95 %-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемых мишеней, при которой 95 % тестов дают положительный результат).



---

## 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. Не допускается замораживание реагентов.

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

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. Не допускается замораживание реагентов.

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 ГМО Растение 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® ГМО Растение» 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](http://www.nextbio.ru).

## 12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



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