




Набор реагентов для выявления ДНК домашнего быка (*Bos taurus*),
домашней овцы (*Ovis aries*) и домашней лошади (*Equus caballus*) в продуктах
питания и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® Говядина / Баранина / Конина»

АмплиПрайм® Говядина / Баранина / Конина

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2039-1Z  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

 **НекстБИО**
Биотехнологическая
компания

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.....	10
7.1. Подготовка материала к исследованию	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.....	14
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	15
9.1. Предел обнаружения	15
9.2. Аналитическая специфичность	15
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	16
10.1. Срок годности.....	16
10.2. Транспортирование	16
10.3. Хранение.....	16
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	17
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	17

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
ОК	отрицательный контроль
ПК	положительный контроль
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК домашнего быка (*Bos taurus*), домашней овцы (*Ovis aries*) и домашней лошади (*Equus caballus*) в продуктах питания и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Говядина/Баранина/Конина».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Говядина/Баранина/Конина», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Говядина/Баранина/Конина» предназначен для выявления ДНК домашнего быка (*Bos taurus*), домашней овцы (*Ovis aries*) и домашней лошади (*Equus caballus*) в сырье животного происхождения (частях тушек, фарше и т.д.), пищевых продуктах, содержащих компоненты животного происхождения, в том числе продуктах, подвергшихся кулинарной обработке, и кормах и кормовых добавках для животных, содержащих компоненты животного происхождения, методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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 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 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 Bos/Ovis/Equus	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В1	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Bos/Ovis/Equus	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО Bos/Ovis/Equus	1,10	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов «АмплиПрайм® Говядина/Баранина/Конина»	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
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 *Bos/Ovis/Equus*) и одновременной амплификации видоспецифических участков митохондриальной ДНК домашнего быка (*Bos taurus*), домашней овцы (*Ovis aries*) и домашней лошади (*Equus caballus*), а также искусственно-синтезированной последовательности ДНК ВКО *Bos/Ovis/Equus* с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО *Bos/Ovis/Equus* 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 домашнего быка (*Bos taurus*), домашней овцы (*Ovis aries*) и домашней лошади (*Equus caballus*), а также амплификация последовательности ВКО *Bos/Ovis/Equus*. Результаты амплификации регистрируются по 4-м различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ¹	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ДНК домашнего быка (<i>Bos taurus</i>)	ДНК домашней овцы (<i>Ovis aries</i>)	ДНК домашней лошади (<i>Equus caballus</i>)	ДНК ВКО Bos/Ovis/Equus
Область амплификации	ген COX3	ген CYTB	ген CYTB	искусственно-синтезированная последовательность

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор «АмплиПрайм® Говядина/Баранина/Конина» 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® Говядина/Баранина/Конина» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – «ВКО Bos/Ovis/Equus», входящим в состав данного набора реагентов. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

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.

4.5. 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, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

¹ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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» и ГОСТ Р 53214-2008 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения».

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, насадки для блендера 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.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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, стерильный.

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

6.1.3. Скальпель, ножницы.

6.1.4. Пинцет, шпатель.

6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

6.2.1. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 2,0 мл.

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

6.2.3. Фарфоровые ступки и песты или гомогенизатор.

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

6.2.5. Фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор.

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

6.2.7. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

- набор позволяет выделять ДНК из сырья животного происхождения (частей тушек, фарша и т.д.), пищевых продуктов, содержащих компоненты животного происхождения, в том числе продуктов, подвергшихся кулинарной обработке, и кормов, кормовых добавок для животных, содержащих компоненты животного происхождения, для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;
- состав набора включает реагент ОКО (отрицательный контрольный образец);
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 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:

- 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 раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя – в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

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

- наличие 4 и более независимых каналов флуоресцентной детекции с характеристиками, указанными в таблице 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, поддерживающий температурный режим от 2 °C до 8 °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:

- Сырье животного происхождения (части тушек, фарш и т.д.);
- Пищевые продукты, содержащие компоненты животного происхождения, в том числе продукты, подвергшиеся кулинарной обработке;
- 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.

7.1. Подготовка материала к исследованию

Пробы сырья, продуктов и кормов животного происхождения гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатно-солевом буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции ДНК.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории²:

- 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)³ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО Bos/Ovis/Equus).

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

- объем **исследуемого образца**⁴ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента **ВКО Bos/Ovis/Equus** – **10 мкл** в каждую экстрагируемую пробу;
- объем реагента **ОКО** – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **50 мкл**.

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 применению.

8.2.1. Рассчитать объемы для **ПЦР-смеси Bos/Ovis/Equus** и **Буфера В1**, 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 Bos/Ovis/Equus	10,0*(N+1)	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В1	5,0*(N+1)	

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Bos/Ovis/Equus** и **Буфером В1**, осадить капли на вортексе.

² 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».

³ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

⁴ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

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 Bos/Ovis/Equus**.

б) отрицательный контроль экстракции (ОКО) – 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 ⁵ , 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.

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.

⁵ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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 4-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁶	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК домашнего быка (<i>Bos taurus</i>)	ДНК домашней овцы (<i>Ovis aries</i>)	ДНК домашней лошади (<i>Equus caballus</i>)	ДНК ВКО

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;

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

– 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.

Таблица 8

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 значение Ct не выше граничного ⁷
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
ПКО Bos/Ovis/Equus (положительный контроль)	Определено значение Ct не выше граничного	Определено значение Ct не выше граничного	Определено значение Ct не выше граничного	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 FAM и / или R6G и / или ROX отсутствуют, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено не выше граничного ⁷ .	ДНК домашнего быка и / или домашней овцы и / или домашней лошади не обнаружена
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G и / или ROX определено не выше граничного. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено или отсутствует.	ДНК домашней лошади и / или ДНК домашнего быка и / или ДНК домашней овцы обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено выше граничного, при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G и / или ROX отсутствуют или определено выше граничного.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G и / или ROX определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено не выше граничного.	Результат недостоверный / сомнительный Рекомендуется повторить анализ

ВНИМАНИЕ! В случае получения сомнительного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения сомнительного или получения отрицательного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование, начиная с этапа отбора материала.

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора FAM, R6G или ROX определено значение 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.

⁷ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

8.6.2. 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.

8.6.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, 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.

8.6.4. 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® Говядина / Баранина / Конина» был определен с использованием пробит-анализа с 95 %-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 10). Значения характеристики, указанные в таблице 10, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 10

Предел обнаружения набора

ДНК-мишень	Предел обнаружения по Probit 95 %, копий/мл
ДНК <i>Bos taurus</i> (домашний бык)	1,0x10 ³
ДНК <i>Ovis aries</i> (домашняя овца)	1,0x10 ³
ДНК <i>Equus caballus</i> (домашняя лошадь)	1,0x10 ³

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® Говядина / Баранина / Конина» обнаруживает фрагменты ДНК *Bos taurus* (домашнего быка), *Ovis aries* (домашней овцы) и ДНК *Equus caballus* (домашней лошади).

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК животных и растений, указанных в таблице 11. ДНК других животных и растений в концентрации не менее 1x10⁶ копий/мл вносили в образцы биоматериала, не содержащие ДНК *Bos taurus* (домашнего быка), *Ovis aries* (домашней овцы) и ДНК *Equus caballus* (домашней лошади).

Исследованные организмы	
Обыкновенный карп (<i>Cyprinus carpio</i>)	Русский осетр (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)
Азовско-черноморская тарань (<i>Rutilus heckelii</i>)	Сибирский осетр (<i>Acipenser baerii</i>)
Речной окунь (<i>Perca fluviatilis</i>)	Обыкновенный судак (<i>Sander lucioperca</i>)
Чехонь (<i>Pelecus cultratus</i>)	Обыкновенный лещ (<i>Abramis brama</i>)
Речная форель (<i>Salmo fario</i>)	Культурная соя (<i>Glycine max</i>)
Кукуруза сахарная (<i>Zéa máys</i>)	Рапс (<i>Brássica nápus</i>)
Домашняя свинья (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	Благородный олень (<i>Cervus elaphus</i>)
Домашняя собака (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Европейский кролик (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
Мышь домовая (<i>Mus musculus</i>)	Домашняя кошка (<i>Félis silvéstris cátus</i>)
Домашняя курица (<i>Gallus gallus</i>)	Серая крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)
Домашняя утка (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Домашняя индейка (<i>Meleagris gallopavo</i>)
Обыкновенный перепел (<i>Coturnix coturnix</i>)	Серый гусь (<i>Anser anser</i>)
Сизый голубь (<i>Columba livia</i>)	-

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов и вирусов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

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 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. 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.

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® Говядина / Баранина / Конина» 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



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