






Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и нутрии (*Myocastor coypus*) в продуктах питания, кормах, сырье и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Кролик / Нутрия»

АмплиПрайм® Кролик / Нутрия

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Форма выпуска 1	REF	V2177-11		48
Форма выпуска 2	REF	V2177-12		48
Форма выпуска 3	REF	V2177-13		48

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	6
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	7
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	7
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	9
6.1. Взятие исследуемого материала.....	9
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала	9
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	10
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	10
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	11
7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала	12
7.2. Предварительная обработка.....	12
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. Интерпретация результатов	16
8.6. 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	20
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	21

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Сt	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
НК	нуклеиновая кислота
ОК	отрицательный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец экстракции
К-	отрицательный контроль ПЦР
ПК	положительный контроль
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНКаза	рибонуклеаза
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и нутрии (*Myocastor coypus*) в продуктах питания, кормах, сырье и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Кролик / Нутрия».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Кролик / Нутрия», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Кролик / Нутрия» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления и дифференциации ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и / или нутрии (*Myocastor coypus*) в 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.), в биологическом материале (внутренние органы, части туши) для выявления фальсификаций сырья, пищевой продукции и детекции несанкционированных примесей в кормах методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор реагентов выпускается в трёх формах. Формы выпуска предназначены для проведения амплификации ДНК методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Формы выпуска предназначены для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитаны на проведение 48 реакций, включая контроли. Формы могут использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 1 рассчитана на проведение 48 реакций, включая контроли. Форма включает две ПЦР-смеси (**ПЦР-смесь Кролик** и **ПЦР-смесь Нутрия**) в пробирках 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок и позволяет выявлять и дифференцировать ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и / или нутрии (*Myocastor coypus*) в исследуемых образцах.

Форма выпуска 2 рассчитана на проведение 48 реакций, включая контроли. Форма включает одну ПЦР-смесь (**ПЦР-смесь Кролик**) в пробирке 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок и позволяет выявлять ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*) в исследуемых образцах.

Форма выпуска 3 рассчитана на проведение 48 реакций, включая контроли. Форма включает одну ПЦР-смесь (**ПЦР-смесь Нутрия**) в пробирке 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок и позволяет выявлять ДНК нутрии (*Myocastor coypus*) в исследуемых образцах.

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь Кролик	0,60	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ с дУТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-смесь Нутрия	0,60	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ с дУТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,30	2 пробирки	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Кролик	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ПКО Нутрия	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь Кролик	0,60	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ с дУТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,30	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Кролик	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 3			
ПЦР-смесь Нутрия	0,60	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ с дУТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,30	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Нутрия	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1, 2 или 3)	-	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 к набору для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении амплификации участков ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*), нутрии (*Myocastor coypus*) и экзогенного контроля (искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО-FL или ВКО В)¹ при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-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 пробирках амплифицируются участки ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и /или нутрии (*Myocastor coypus*) и искусственно синтезированной последовательности ДНК экзогенного контрольного образца ВКО-FL или ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по двум каналам флуоресцентной детекции в каждой ПЦР-смеси (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

ПЦР-смесь	ПЦР-смесь Кролик		ПЦР-смесь Нутрия	
Канал для флуорофора	FAM	R6G ²	FAM	R6G ²
ДНК-мишень	ВКО-FL / ВКО В ¹	ДНК европейского кролика (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	ВКО-FL / ВКО В	ДНК нутрии (<i>Myocastor coypus</i>)
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	мт ДНК	искусственно синтезированная последовательность	мт ДНК

¹ ВКО В входит в состав наборов реагентов, рекомендованных Производителем для экстракции НК из исследуемого материала («МагноПрайм® ВЕТ», «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия). ВКО-FL входит в состав наборов реагентов, рекомендованных Производителем для экстракции НК из исследуемого материала («МагноПрайм® ГМО», «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия).

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

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для исследовательских 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® Кролик / Нутрия» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом экстракции – ВКО, входящим в состав наборов реагентов для экстракции. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. 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.

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

4.7. 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. 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 правил «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)» (утверждены приказом руководителя Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997).

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

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

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

6.1.4. Аналитические или прецизионные весы.

6.1.5. Стерильные перчатки.

6.1.6. Ножницы, скальпели, шпатели, пинцет.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл или 2,0 мл.

6.2.2. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5 или 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, скальпели.

6.2.7. Анатомический пинцет.

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

6.2.9. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.10. Вортекс.

6.2.11. Стерильный физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

- набор позволяет выделять ДНК из продуктов питания и кормов, содержащих компоненты растительного происхождения (заменители молока, печенье, каши, хлопья, шрот, текстураты и т.п.), продуктов питания, полуфабрикатов, сырья и кормов животного происхождения (кормовые добавки, комбикорма, мясокостная мука, консервы и т.п.), биологического материала (внутренние органы, части туши) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»;

- состав набора включает реагент ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО В / ВКО-FL³ (внутренний 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/РНКаз, 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 прибора 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 прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 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 или отдельно вортекс и микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, 0,6 мл, 0,2 мл.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

³ ВКО В входит в состав наборов реагентов, рекомендованных Производителем для экстракции НК из исследуемого материала («МагноПрайм® ВЕТ», «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия). ВКО-FL входит в состав наборов реагентов, рекомендованных Производителем для экстракции НК из исследуемого материала («МагноПрайм® ГМО», «МагноПрайм® ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия).

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя - в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

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

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM и R6G 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

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

6.4.9. Холодильник, поддерживающий температурный режим 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 образцы ДНК, экстрагированные из следующих образцов:

- 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.);
- биологический материал (внутренние органы, части туши).

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. Взятие и транспортировка исследуемого материала

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, используют одноразовые герметично закрывающиеся пластиковые контейнеры или пакеты, инструменты для отбора и измельчения материала, применяют однократно или стерилизуют в соответствии с регламентирующими документами.

Внутренние органы массой не более 1 г отбирают в стерильные контейнеры (пробирки).

Части туши отбирают пинцетом или шпателем, предварительно сделав разрез ножницами или скальпелем.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

7.2. Предварительная обработка

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

Для наборов реагентов для экстракции НК «МагноПрайм® ВЕТ» и / или «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ»:

Исследуемые образцы 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 г в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции ДНК.

Для наборов реагентов для экстракции НК «МагноПрайм® ФИТО» и / или «МагноПрайм® ГМО»:

Исследуемые образцы гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора. К гомогенизированным образцам добавить Буфер Р⁴ 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 до 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 г⁵ в течение 5 мин. Полученный супернатант использовать для дальнейшей экстракции.

⁴ Реагент входит в состав набора «МагноПрайм® ГМО» и «МагноПрайм® ФИТО».

⁵ Для мини-центрифуг Eppendorf MiniSpin®/ MiniSpin® plus 6 500 обр/мин.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории⁶:

- температура окружающего воздуха от 20 °С 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)⁷ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК во все пробы (включая ОКО) следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО).

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

- объем исследуемого образца⁸ – 200 мкл в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ВКО – 10 мкл в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- объем реагента ОКО – 100 мкл в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – 100 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 использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы ПЦР-смеси Кролик и/или ПЦР-смеси Нутрия (с учетом формы выпуска набора) 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 Кролик / ПЦР-смесь Нутрия	10,0*(N+1)	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	5,0*(N+1)	

⁶ 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».

⁷ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

⁸ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Кролик / ПЦР-смесью Нутрия 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, полученных 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 ПКО Кролик** и / или **ПКО Нутрия**.

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

в) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл** реагента **К-**.

Примечание: ПКО Кролик используется при тестировании образцов на ПЦР-смеси Кролик. ПКО Нутрия используется при тестировании образцов на ПЦР-смеси Нутрия.

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	

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.

ВНИМАНИЕ! При одновременном тестировании обеих ПЦР-смесей в амплификаторах роторного типа необходимо в первую лунку прибора помещать пробирку с ПЦР-смесью Кролик и образцом ПКО Кролик.

ВНИМАНИЕ! 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 инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны в кратком руководстве, прилагаемом 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 2-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

ПЦР-смесь	ПЦР-смесь Кролик		ПЦР-смесь Нутрия	
	FAM	R6G	FAM	R6G
Канал для флуорофора				
Продукт амплификации	ДНК ВКО	ДНК европейского кролика (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	ДНК ВКО	ДНК нутрии (<i>Myocastor coypus</i>)

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

– вручную в соответствии с таблицами 10 и/или 11 (в зависимости от используемой формы выпуска набора) и кратким руководством, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблицах 8 и/или 9 (в зависимости от используемой формы выпуска набора) 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/или 9 и в таблицах 10 и/или 11 соответственно (в зависимости от используемой формы выпуска набора), и в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Таблица 8

Критерии валидности для контрольных образцов на ПЦР-смеси Кролик

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ОКО (отрицательный контрольный образец)	Определено значение Ct не выше граничного ⁹	Отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует
ПКО Кролик (положительный контроль)	Отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного

Таблица 9

Критерии валидности для контрольных образцов на ПЦР-смеси Нутрия

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ОКО (отрицательный контрольный образец)	Определено значение Ct не выше граничного	Отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует
ПКО Нутрия (положительный контроль)	Отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного

⁹ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов на ПЦР-смеси Кролик

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного ¹⁰ .	ДНК Европейского кролика (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G 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 FAM определено или отсутствует.	ДНК Европейского кролика (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует или определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено выше граничного.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного.	Результат недостоверный / сомнительный Рекомендуется повторить анализ

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов на ПЦР-смеси Нутрия

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного.	ДНК Нутрии (<i>Myocastor coypus</i>) не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G 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 FAM определено или отсутствует.	ДНК Нутрии (<i>Myocastor coypus</i>) обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует или определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено выше граничного.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM 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 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.

8.6.2. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора R6G 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.

¹⁰ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

8.6.3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G определены значения пороговых циклов (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.

8.6.4. 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 обнаружения¹¹

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Кролик / Нутрия» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл для ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и $1,0 \times 10^3$ копий/мл для ДНК нутрии (*Myocastor coypus*) (см. таблицу 12). Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

Предел обнаружения набора

НК-мишень	Предел обнаружения, копий/мл
ДНК европейского кролика (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	$1,0 \times 10^3$
ДНК нутрии (<i>Myocastor coypus</i>)	$1,0 \times 10^3$

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и / или нутрии (*Myocastor coypus*).

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК различных животных и растений (см. таблицу 13).

¹¹ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация выявляемой ДНК, при которой 95% тестов дают положительный результат).

Растения и животные, используемые для оценки аналитической специфичности

Растение/животное	
Домашняя лошадь (<i>Equus caballus</i>)	Домашняя овца (<i>Ovis aries</i>)
Домашний бык (<i>Bos taurus</i>)	Домашняя свинья (<i>Sus domesticus</i>)
Домашняя курица (<i>Gallus gallus</i>)	Домовая мышь (<i>Mus musculus</i>)
Обыкновенный бобр (<i>Castor fiber</i>)	Зяц-русак (<i>Lepus europaeus</i>)
Домашняя утка (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Серый гусь (<i>Anser anser</i>)
Индейка (<i>Meleagris gallopavo</i>)	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)
Рапс (<i>Brassica napus</i>)	Рис посевной (<i>Oryza sativa</i>)
Гречиха посевная (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Свекла обыкновенная (<i>Beta vulgaris</i>)
Картофель (<i>Solanum tuberosum</i>)	Мягкая пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)
Томат (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Кукуруза сахарная (<i>Zea mays</i>)

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных растений и животных 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.

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 Кролик / ПЦР-смеси Нутрия 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® Кролик / Нутрия» 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



Номер серии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению