



Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017 в кормах, сырье и продуктах питания методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Кукуруза MON88017»

АмплиПрайм® Кукуруза MON88017

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Форма выпуска 1	REF	G2081-21		96
Форма выпуска 2	REF	G2081-22		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	9
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	10
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	11
7.1. Предварительная обработка	11
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала	12
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	12
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	13
8.4. Анализ и обработка результатов	14
8.5. Интерпретация результатов	15
8.6. Оформление результатов исследования	16
8.7. Возможные ошибки	17
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	18
9.1. Предел обнаружения	18
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения	18
9.3. Аналитическая специфичность	18
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	19
10.1. Срок годности	19
10.2. Транспортирование	19
10.3. Хранение	19
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ГМ	генно-модифицированный
ГМИ	генно-модифицированные источники
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
К-	отрицательный контроль ПЦР
ОК	отрицательный контроль
ОКО	отрицательный контроль экстракции
К1	калибровочный образец 1
К2	калибровочный образец 2
К3	калибровочный образец 3
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017 в кормах, сырье и продуктах питания методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Кукуруза MON88017».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Кукуруза MON88017», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Кукуруза MON88017» предназначен для выявления и количественного определения доли (%) ДНК генетически модифицированной линии кукурузы MON88017 от общего количества ДНК кукурузы 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 гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированных из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Исследуемые образцы предварительно проанализировать с использованием наборов реагентов «АмплиПрайм® Растение» и «АмплиПрайм® ГМО-скрин» и/или «АмплиПрайм® ГМО Растение» производства ООО «НекстБио», Россия.

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 двух формах, которые могут 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 может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение 96 реакций, включая контроли. Форма может быть использована совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение 48 реакций, включая контроли. Форма может быть использована совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь MON88017	0,60	2 пробирки	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 Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
K1 MON88017	0,15	2 пробирки	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 MON88017	0,15	2 пробирки	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K3 MON88017	0,15	2 пробирки	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь MON88017	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 Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
K1 MON88017	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 MON88017	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K3 MON88017	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов «АмплиПрайм® Кукуруза MON88017» (форма выпуска 1 или 2)	-	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	-
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Макрос для анализа и расчета результатов в формате Microsoft Excel	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной амплификации участков ДНК выявляемых трансформационных событий линии ГМ-кукурузы MON88017 и участка генома не трансгенной кукурузы (внутренний эндогенный контроль) 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».

Для проведения количественного теста, ДНК, экстрагированную из исследуемых образцов, амплифицируют одновременно с калибраторами K1 MON88017, K2 MON88017 и K3 MON88017 – образцами с известным соотношением ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017 к эндогенному контролю – ДНК кукурузы. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная прямая зависимости разницы C_t по каналу ГМ-линии и C_t по каналу эндогенного контроля, по которой происходит определение доли (%) ДНК генетически модифицированной линии кукурузы MON88017 от общего количества ДНК кукурузы в исследуемых образцах.

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 термоллабилен 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 кукурузы и ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017. Результаты амплификации регистрируются по двум каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ¹
ДНК-мишень	ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017	ДНК кукурузы (<i>Zea mays</i>)
Область амплификации	Область интеграции ГМ-элемент MON88017 и геном кукурузы	Участок генома кукурузы

Относительное количество ДНК ГМ-линии кукурузы MON88017 определяется с помощью калибровочной прямой, для построения которой тестируются калибровочные стандарты при каждом проведении анализа.

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

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио», каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® Кукуруза MON88017» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор «АмплиПрайм® Кукуруза MON88017» 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. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

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 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 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, однократного 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. Центрифуга-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, или 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);

- 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. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции - 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 двух и более 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 поддерживающей 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 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 Р² 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-2,0 мл отобрать 1,2 мл полученной суспензии. Центрифугировать пробирки с исследуемыми образцами при 3 000g 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.

² Реагент входит в состав набора «МагноПрайм[®] ГМО» и «МагноПрайм[®] ФИТО» производства ООО «НекстБио», Россия.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории³:

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

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

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

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции НК.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (**ОКО**)⁴.

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

- объем **исследуемого образца**⁵ – **200 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- 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.

Примечание: возможно использование образцов ДНК, выделенных для предварительного анализа с использованием наборов реагентов «АмплиПрайм® Растение» и «АмплиПрайм® ГМО-скрин» и/или «АмплиПрайм® ГМО Растение» производства ООО «НекстБио», Россия.

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! При проведении количественного анализа все исследуемые образцы и калибраторы тестируются в двух повторах каждый; при проведении качественного анализа допускается тестирование исследуемых образцов и положительного контроля в одном повторе.

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 MON88017** 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.

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

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

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

Расчет объемов компонентов для реакционной смеси при проведении анализа

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь MON88017	10,0*(N+1)	N – количество амплифицируемых образцов ДНК, включая контрольные образцы
Буфер В	5,0*(N+1)	

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью MON88017** 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.

ВНИМАНИЕ! При проведении количественного анализа все исследуемые образцы и калибраторы тестируются в двух повторах каждый; при проведении качественного анализа допускается тестирование исследуемых образцов и положительного контроля в одном повторе.

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:

При проведении качественного анализа:

а) **Положительный контроль ПЦР (К1)** – в одну пробирку с реакционной смесью для образца **К1** внести **10 мкл** реагента **К1 MON88017**

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

в) **Отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в одну пробирку с реакционной смесью для образца **ОК** внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

При проведении количественного анализа:

а) Образец **К1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К1 MON88017**.

б) Образец **К2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К2 MON88017**.

в) Образец **К3** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К3 MON88017**.

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

д) **Отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в одну пробирку с реакционной смесью 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	

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! Для амплификаторов роторного типа первой пробиркой всегда ставится пробирка с образцом K1 (K1 MON88017).

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

8.3.5. Запустить выполнение единой 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 для автоматической обработки результатов, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

– в ручном режиме с помощью Макроса для анализа и расчета результатов в формате Microsoft Excel, согласно инструкции по его применению и вкладышу для ручной обработки результатов, прилагаемому к набору. Макрос для анализа и расчета результатов размещен на официальном сайте Производителя по адресу: <https://www.nextbio.ru>.

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

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 2-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G
Продукт амплификации	Область интеграции ГМ-элемент MON88017 и геном кукурузы	Участок генома кукурузы

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

– вручную в соответствии с таблицей 9 и вкладышем для ручной обработки результатов, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 8;

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше для автоматической обработки результатов, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 8 и 9 соответственно.

ВНИМАНИЕ! Соответствие критериям валидности должно выполняться для каждого повтора тестируемого образца. Если хотя бы для одного из повторов значения порогового цикла (Ct) не укладываются в граничные, указанные в таблицах 8 и 9, результат анализа для данного образца считается недостоверным.

Таблица 8

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
К1 MON88017 (К1)	Определено значение Ct не выше граничного ⁶	Определено значение Ct не выше граничного
К2 MON88017 (К2)	Определено значение Ct не выше граничного	
К3 MON88017 (К3)	Определено значение Ct не выше граничного	
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует	
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует	
К1 MON88017 (К1)	Коэффициент корреляции $R^2 > 0,97$. Полученные расчетные значения %-го содержания укладываются в диапазоны, указанные во вкладыше для ручной обработки результатов, прилагаемом к набору реагентов	
К2 MON88017 (К2)		
К3 MON88017 (К3)		

⁶ Граничные значения Ct указаны во вкладыше для ручной обработки результатов, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Результат расчета концентрации является достоверным, если коэффициент корреляции R^2 составляет более 0,97, при этом полученные расчетные значения образцов K1 MON88017, K2 MON88017 и K3 MON88017 укладываются в диапазоны значений C_t и процентного содержания, указанные во вкладыше для ручной обработки результатов, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше для ручной обработки результатов, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного и количественного анализа

Результаты (значение порогового цикла (C_t) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует, при этом значение C_t по каналу для флуорофора R6G определено не выше граничного ⁷ .	ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017 не обнаружена
Значение C_t по каналу для флуорофора FAM определено, и значение C_t по каналу для флуорофора R6G определено не выше граничного. Кривые флуоресценции исследуемой пробы по данным каналам пересекают пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017 обнаружена Количество ДНК подлежит расчету в программе FRT-Manager или вручную с помощью Макроса для анализа и расчета результатов в формате Microsoft Excel
Значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено, а значение C_t по каналу для флуорофора R6G отсутствует или определено выше граничного.	Невалидный! Требуется повторить ПЦР и/ или этап выделения ДНК

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t для исследуемых образцов указаны во вкладыше для ручной обработки результатов, прилагаемом к набору.

8.6. Оформление результатов исследования

Результатом исследования при проведении **качественного анализа** является наличие или отсутствие в анализируемом образце ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017, что может быть представлено в виде заключения «ДНК линии ГМ- кукурузы MON88017 обнаружена / не обнаружена».

При проведении **количественного анализа в ручном режиме** результат исследования может быть представлен в следующем виде:

- «ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017 обнаружена в концентрации менее 0,1 % / более 10 %» (если количественный результат исследования находится вне линейного диапазона измерения набора);

- «ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017 обнаружена в концентрации $N \% \pm U$ », где U – расширенная неопределенность (не более 30 %), а N – полученная в ходе анализа концентрация ДНК линии (если количественный результат исследования находится в границах линейного диапазона измерения набора от 0,1 % до 10 %).

⁷ Граничные значения C_t указаны во вкладыше для ручной обработки результатов, прилагаемом к набору.

8.7. Возможные ошибки

8.7.1. Коэффициент корреляции (R2), полученный при расчете в Макросе для анализа и расчета результатов в формате Microsoft Excel или при использовании ПО FRT Manager, менее 0,97. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа амплификации.

8.7.2. Полученные расчетные значения для образцов K1 MON88017, K2 MON88017, K3 MON88017 не укладываются в диапазоны расширенной неопределённости (не более 30 %). Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа амплификации.

8.7.3. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G 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.

8.7.4. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G 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.

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

8.7.6. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора R6G, 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 обнаружения⁸

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Кукуруза MON88017» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл или 0,1 % ГМИ. Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Набор реагентов позволяет измерять концентрацию фрагментов ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017.

Диапазон количественного определения составляет 0,1 % – 10 % ГМИ. Систематическая погрешность измерения составляет не более 30% для всех точек диапазона количественной оценки. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении алгоритма проведения исследования и расчета результатов, указанного в данной Инструкции.

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК линии ГМ-кукурузы MON88017.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК растений и животных, а также ДНК ГМ-линий растений (см. таблицу 10).

Таблица 10

ДНК ГМ-линий, растений, животных, используемых для оценки аналитической специфичности

ДНК ГМ-линий, растений и животных			
Кукуруза MON863	Кукуруза 3272	Соя BPS-CV127-9	Мягкая пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)
Кукуруза NK603	Кукуруза 5307	Соя GTS40-3-2	Овес посевной (<i>Avena sativa</i>)
Кукуруза MON89034	Рапс MS8	Соя FG72	Рис посевной (<i>Oryza sativa</i>)
Кукуруза TC1507	Рапс MS8×Rf3	Соя SYHTOH2	Гречиха посевная (<i>Fagopyrum esculentum</i>)
Кукуруза Bt11	Рапс T45	Соя MON87701	Картофель (<i>Solanum tuberosum</i>)
Кукуруза MIR604	Рапс GT73	Соя MON89788	Свекла обыкновенная (<i>Beta vulgaris</i>)
Кукуруза MIR162	Рапс MON88302	Рапс GS40/90	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)
Кукуруза GA21	Кукуруза 5307	Рапс MS1	Томат (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
Кукуруза T25	Соя A2704-12	Рапс Oxy235	Яблоня домашняя (<i>Malus domestica</i>)
Кукуруза MON810	Соя A5547-127	Рапс RF3	Свинина (<i>Suidae spp.</i>)
Рапс T45	Рапс GT73	-	Домашний бык (<i>Bos taurus</i>)
Рапс RF1	Рапс RF2	-	Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)
Рапс Topas19/2	Рапс MON88302	-	Домашняя курица (<i>Gallus gallus domesticus</i>)

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных растений и животных, а также линий ГМ-растений с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

⁸ 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 MON88017 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® Кукуруза MON88017» 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