



Набор реагентов для количественного определения ДНК линии ГМ-сои А5547-127 в кормах, сырье и продуктах питания методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»

АмплиПрайм® Соя А5547-127

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Форма выпуска 1	REF	G2080-21		96
Форма выпуска 2	REF	G2080-22		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



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	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 при использовании формы выпуска 1 или 2	12
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции при использовании форм выпуска 1 и 2.....	13
8.4. Анализ и обработка результатов	14
8.5. Интерпретация результатов	14
8.6. Возможные ошибки	15
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	16
9.1. Линейный диапазон измерения и предел измерения.....	16
9.2. Аналитическая специфичность	16
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	17
10.1. Срок годности	17
10.2. Транспортирование	17
10.3. Хранение	17
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	17
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	18

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

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

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для количественного определения ДНК линии ГМ-сои А5547-127 в кормах, сырье и продуктах питания методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Соя А5547-127».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Соя А5547-127», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Соя А5547-127» предназначен для идентификации и определения доли (%) ДНК генетически модифицированной линии сои А5547-127 от общего количества ДНК сои 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».

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

Набор реагентов рекомендуется использовать для анализа проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе «Дополнительное оборудование и материалы», и предварительно проанализированных с использованием наборов реагентов «АмплиПрайм® Растение» и «АмплиПрайм® ГМО-скрин» производства ООО «НекстБио».

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 А5547-127	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.
К1 А5547-127	0,15	2 пробирки	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 А5547-127	0,15	2 пробирки	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К3 А5547-127	0,15	2 пробирки	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь А5547-127	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.
К1 А5547-127	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 А5547-127	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К3 А5547-127	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов «АмплиПрайм® Соя А5547-127» (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	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной амплификации участков ДНК выявляемых трансформационных событий линии ГМ-сои А5547-127 и гена Le1 сои (внутренний эндогенный контроль) при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Для проведения количественного теста, ДНК, экстрагированную из исследуемых образцов, амплифицируют одновременно с калибраторами K1 А5547-127, K2 А5547-127 и K3 А5547-127 – образцами с известным соотношением ДНК линии ГМ-сои А5547-127 к эндогенному контролю сои - гену Le1. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная прямая зависимости разницы Ct по каналу ГМ-линии и Ct по каналу эндогенного контроля, по которому происходит определение концентрации ДНК линии ГМ-сои А5547-127 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 термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участки ДНК сои и ДНК линии ГМ-сои А5547-127. 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-сои А5547-127	ДНК сои
Область амплификации	Область интеграции. ГМ-элемент А5547-127 и геном сои	ген Le1

Относительное количество ДНК ГМ-линии сои А5547-127 определяется с помощью калибровочной кривой, 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® Соя А5547-127» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор «АмплиПрайм® Соя А5547-127» 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 СП 1.3.2322-08.

- 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 или 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 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 мл с ускорением не менее 10 000 g.

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

6.2.5. 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/РНказ, 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, либо любой другой рекомендованный производителем набор, зарегистрированный в РФ и 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»;

- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;

- 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:

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

6.4.7. Автоматические дозаторы переменного объема.

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

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM 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°C;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;
- скорость нагрева не менее 2°C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1°C/сек.

6.4.9. Холодильник от 2 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 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 50 мг образца. В зависимости от консистенции образца продолжить гомогенизацию в ступке до получения однородной суспензии, либо тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе.

В чистые промаркированные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл отобрать 1,2 мл полученной суспензии. 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».

² Реагент входит в состав набора «МагноПрайм ГМО» и «МагноПрайм ФИТО».

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 одном повторе.

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» производства ООО «НекстБио».

8.2. Подготовка реагентов для амплификации при использовании формы выпуска 1 или 2

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.

ВНИМАНИЕ! Исследуемые образцы и калибраторы тестируются в двух повторах каждый.

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси A5547-127** 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

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь A5547-127	$10,0 \cdot (2N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов ДНК, включая контроли
Буфер В	$5,0 \cdot (2N+1)$	

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью A5547-127** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.1.1. 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 при использовании форм выпуска 1 и 2

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! Программирование амплификатора устанавливается автоматически при использовании ПО FRT Manager.

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

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью калибраторы:

- а) Образец **K1** – в одну пробирку внести **10 мкл K1 A5547-127**.
- б) Образец **K2** – в одну пробирку внести **10 мкл K2 A5547-127**.
- в) Образец **K3** – в одну пробирку внести **10 мкл K3 A5547-127**.

8.3.3. Внести контрольные образцы:

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

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

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

ВНИМАНИЕ! Для амплификаторов роторного типа первой пробиркой всегда ставится K1 A5547-127.

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

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала с помощью 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/>.

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов необходимо проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager согласно руководству пользователя.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 2 каналам детекции (см. таблицу 6).

Таблица 6

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁶
Продукт амплификации	ГМ-элемент A5547-127 и геном сои	ДНК сои (ген Le1)

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager согласно руководству пользователя. Критерии валидности результатов, полученных для контролей и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 7 - 8.

ВНИМАНИЕ! Соответствие критериям оценки должно выполняться для каждого повтора образца. Если значения порогового цикла для одного из повторов образца не укладываются в приведенные в таблице 8 значения, результат для данного образца считается недостоверным.

Таблица 7

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G ⁶
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Отсутствует
K1 A5547-127	Ct ≤ 33,0 / ≤ 33,5	Ct ≤ 32,0 / ≤ 34,0
K2 A5547-127	Ct ≤ 36,5 / ≤ 36,5	
K3 A5547-127	Ct ≤ 40,0 / ≤ 40,0	

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

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM > 45,0 или отсутствует, при этом значение Ct по каналу R6G определено ≤ 40,0	ДНК линии ГМ-сои A5547-127 не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено ≤ 45,0, при этом значение Ct по каналу R6G определено ≤ 40,0 Кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции	ДНК линии ГМ-сои A5547-127 обнаружена Количество ДНК подлежит расчету в программе FRT-Manager ⁷
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено ≤ 45,0 или отсутствует, при этом значение Ct по каналу R6G определено > 40,0 или отсутствует	Невалидный! Требуется повторить ПЦР и/ или этап выделения на присутствие ГМ-элементов и специфического таксона

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. 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.

8.6.2. 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.

8.6.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). 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 каналам для флуорофоров FAM и 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.

⁷ Количественный расчет содержания ДНК ГМ-линии сои A5547-127 возможен только в пределах линейного диапазона измерения набора ($1,0 \times 10^3$ – $1,0 \times 10^5$ копий/мл, что в пересчете на массовую долю составляет 0,1 – 10%).

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Набор реагентов позволяет измерять концентрацию фрагментов ДНК линии ГМ-сои А5547-127.

Диапазон измерения составляет $1,0 \times 10^3$ – $1,0 \times 10^5$ копий/мл, что в пересчете на массовую долю составляет 0,1 – 10% ГМИ. Систематическая погрешность измерения составляет не более 25% для всех точек диапазона количественной оценки.

Указанные значения достигаются при условии использования программного обеспечения FRT Manager при соблюдении алгоритма проведения исследования и расчета результатов, указанного в данной Инструкции.

Таблица 9

Линейный диапазон измерения и предел измерения набора

Линия ГМ-растения	Линейный диапазон измерения	
	копий/мл	массовая доля ГМ-линии сои, %
Линия ГМ-сои А5547-127	$1,0 \times 10^3$ – $1,0 \times 10^5$	0,1 – 10

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК линии ГМ-сои А5547-127.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК растений и животных, а также линий ГМ-растений (см. таблицу 10) в концентрации не менее $1,0 \times 10^6$ копий/мл. Образцы ДНК вносили в пробы биологического материала, не содержащие определяемую с помощью набора линию ГМ-сои А5547-127.

Таблица 10

Растения и животные, используемые для оценки аналитической специфичности

Растение/животное				
Канал для флуорофора FAM			Канал для флуорофора R6G	
Кукуруза GA21	Кукуруза 3272	Рапс MS1	Мягкая пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	Домашняя свинья (<i>Sus domesticus</i>)
Кукуруза MON863	Кукуруза 5307	Рапс MS8	Свекла обыкновенная (<i>Beta vulgaris</i>)	Гречиха посевная (<i>Fagopyrum esculentum</i>)
Кукуруза T25	Кукуруза NK603	Рапс FG72	Чечевица пищевая (<i>Lens culinaris</i>)	Яблоня домашняя (<i>Malus domestica</i>)
Кукуруза TC1507	Соя MON87701	Рапс T45	Домашняя овца (<i>Ovis aries</i>)	Ячмень обыкновенный (<i>Hordeum vulgare</i>)
Кукуруза Bt11	Соя BPS-CV127-9	Рапс GT73	Овес посевной (<i>Avena sativa</i>)	Домашняя курица (<i>Gallus gallus domesticus</i>)
Кукуруза MIR604	Соя SYHT0H2	Рапс MON88302	Картофель (<i>Solanum tuberosum</i>)	Кукуруза сахарная (<i>Zea mays</i>)
Кукуруза MIR162	Соя A2704-12	Рапс RF1	Домашняя лошадь (<i>Equus caballus</i>)	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
Кукуруза MON810	Соя MON89788	Рапс RF2	Рис посевной (<i>Oryza sativa</i>)	Домашний бык (<i>Bos taurus</i>)
Кукуруза MON88017	Соя FG72	Рапс RF3	Томат (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Европейский кролик (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
Кукуруза MON89034	Соя GTS40-3-2	Рапс GS40/90	Рапс (<i>Brassica napus</i>)	-

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных растений и животных, а также линий ГМ-растений 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 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 А5547-127 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® Соя А5547-127» 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