




Набор реагентов для выявления ДНК кукурузы (*Zea mays*), сои (*Glycine max*) и рапса (*Brassica napus*) в кормах, сырье и продуктах питания методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»

АмплиПрайм® Растение

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF G2024-1Z  96

Только для исследовательских и других немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru



Биотехнологическая
компания

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	5
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	5
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ.....	6
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6.1. Предварительная подготовка исследуемого материала	8
6.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.....	8
6.3. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов.....	8
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	10
7.1. Предварительная обработка	10
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	11
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала.....	11
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	11
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции.....	12
8.4. Анализ и обработка результатов	13
8.5. Используемые настройки амплификаторов.....	13
8.6. Интерпретация результатов	14
8.7. Возможные ошибки	15
9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	16
9.1. Срок годности	16
9.2. Транспортирование.....	16
9.3. Хранение	16
10. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	16
11. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	17

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
К-	отрицательный контроль ПЦР
ПК	положительный контроль
ПКО	положительный контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК кукурузы (*Zea mays*), сои (*Glycine max*) и рапса (*Brassica napus*) в кормах, сырье и продуктах питания методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Растение».

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Растение» (далее по тексту - набор) предназначен для выявления ДНК растений в сырье растительного происхождения (образцы семян, круп, шрота, текстураты, растительные образцы, отобранные из окружающей среды, вегетативные части растений), в пищевой продукции, содержащей компоненты растительного происхождения (заменители молока, печенье, каши, хлопья 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 полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме «реального времени».

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

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

Набор рассчитан на проведение исследования 96 реакций, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь Растение	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Растение	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор плазмидных контролей кукуруза/soя/рапс/растение. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Вкладыш для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной реакции амплификации участков ДНК выявляемых растений, гена NAD1 (внутренний эндогенный контроль), универсального для всех растений, и ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО-FL) 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 одновременно в одной пробирке амплифицируются участки ДНК растений и ДНК ВКО-FL (искусственно-синтезированная последовательность) при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. Результаты амплификации регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ¹	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК сои	ДНК кукурузы	ДНК рапса	ВКО-FL	ДНК растений
Область амплификации	ген Le1	ген ADH	ген Cru A	искусственно-синтезированная последовательность	ген NAD1

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

¹ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX и JOE.

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 «Исследуемый материал». Исследование других видов материалов может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к отбору, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® Растение» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – «ВКО-FL», входящим в состав наборов реагентов для экстракции.

4.5. Пищевые продукты в процессе транспортировки хранить в рекомендованных производителем условиях.

ВНИМАНИЕ! Анализ пищевых продуктов с истекшим сроком годности или при неправильном хранении может показать невалидные результаты.

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

4.7. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

4.8. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) 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, упаковку², включая материалы, инструменты и предметы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты, насадки для блендера и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и, после отмывания в проточной и деионизованной воде, высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения 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. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.1.1. Дистиллированная вода (для замачивания сухих, протравленных и обработанных репеллентами семян и зерен, и промывания продуктов с высоким содержанием сахаров, специй, соли на поверхности материала).

6.1.2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

6.1.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.1.4. Ступка с пестиком или автоматический гомогенизатор с сопутствующими расходными материалами.

6.1.5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 3 000 g.

6.1.6. Вортекс.

6.1.7. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.2.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм ФИТО», или «МагноПрайм ГМО», или набор производства ООО «НекстБио», если он соответствует 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

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

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 200 мкл;

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

6.2.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.3. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.3.1. 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.

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

6.3.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.3.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.3.5. Центрифуга-вортекс.

6.3.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя (не является обязательным требованием).

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

- наличие пяти независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G/HEX/JOE, ROX, Cy5 и Cy5.5 со следующими характеристиками:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690
Cy5.5	655	675	674	694

- для амплификаторов 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.

6.3.9. Холодильник от 2 до 8 °C.

6.3.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.3.11. 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, специй, соли на поверхности материала рекомендуется обработать для удаления избытков углеводов и соли 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 Р³ 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.

7.1.3. В чистые промаркированные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл отобрать 1,2 мл полученной суспензии. Центрифугировать пробирки с исследуемыми образцами при 3 000 g 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.

³ Реагент входит в состав наборов «МагноПрайм ГМО» и «МагноПрайм ФИТО».

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории⁴:

- 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 ДНК.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)⁵ в одном повторе.

При проведении экстракции образцов, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО-FL)⁵.

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

- объем исследуемого образца – **200 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента **ВКО-FL** – **10 мкл** в каждую экстрагируемую пробу;
- 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 для **ПЦР-смеси Растение** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Растение	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	$5,0 \cdot (N+1)$	

⁴ 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».

⁵ Входит в состав набора для проведения экстракции, рекомендованного Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

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

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

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

8.2.7. Внести контрольные образцы:

а) положительный контроль ПЦР (ПК) – в одну пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ПКО Растение**.

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

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

8.2.8. Запрограммировать амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала 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 ⁶ , ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

⁶ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX и JOE.

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

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

8.2.10. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.2.11. 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 и инструкции 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 (см. п. 8.5.) зависят от используемой модели амплификатора.

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

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁶	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК сои	ДНК кукурузы	ДНК рапса	ВКО-FL	ДНК растений
Область амплификации	ген Le1	ген ADH	ген Cru A	искусственно синтезированная последовательность	ген NAD1

8.5. Используемые настройки амплификаторов

Для амплификаторов роторного типа установить значение пороговой линии «Threshold» для всех каналов детекции на уровне 0,05 и применить функцию «Slope correct» («Коррекция уклона»). В окне «Outlier Removal» («Устранение выбросов») задать значение «NTC Threshold» («Порог фона»), равное 10 – 15 %. В окне «Calibrate/gain/Optimisation» («Оптимизация уровня сигнала») для всех каналов установить уровень сигнала от 5 FI до 10 FI.

Для амплификаторов планшетного типа пороговая линия для каждого канала устанавливается на уровне, соответствующем 10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца «ПКО Растение».

При использовании амплификатора «CFX96» следует применять настройки согласно таблице 8.

Параметры шага программы амплификации для прибора «CFX96»

Параметр	Шаг этапа циклирования	Ramp Rate
Step Options	95°C	2,5 °C/sec
	60°C	2,5 °C/sec

8.6. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят вручную в соответствии с таблицей 9. Результат исследования считают достоверным, если получены правильные результаты для контролей в соответствии с таблицей 10.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Амплификатор роторного типа	
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 (ВКО) отсутствует или определено выше 38, при этом значение Ct по всем каналам отсутствует или определено выше 43 – для FAM, выше 37 – для R6G, выше 41 - для ROX, выше 38 для Cy5,5	Недостаточное количество материала, низкое качество материала, ошибка при выделении ДНК
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше 43	ДНК сои обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено не выше 37	ДНК кукурузы обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора ROX определено не выше 41	ДНК рапса обнаружена
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX отсутствуют	ДНК выявляемых растений не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше 38, значения Ct по всем каналам отсутствуют или определены выше 43 – для FAM, выше 37 – для R6G, выше 41 - для ROX	Присутствует примесь растительного компонента неисследованных растений
Амплификатор планшетного типа	
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 (ВКО) отсутствует или определено выше 44, при этом значение Ct по всем каналам отсутствует или определено выше 44 – для FAM, выше 42 – для R6G, выше 44 - для ROX, выше 42 для Cy5,5	Недостаточное количество материала, низкое качество материала, ошибка при выделении ДНК
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше 44	ДНК сои обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено не выше 42	ДНК кукурузы обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора ROX определено не выше 44	ДНК рапса обнаружена
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX отсутствуют	ДНК выявляемых растений не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 определено не выше 42, значения Ct по всем каналам отсутствуют или определены выше 44 – для FAM, выше 42 – для R6G, выше 44 - для ROX.	Присутствует примесь растительного компонента неисследованных растений

Результаты для контролей

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
Амплификатор роторного типа					
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Ct ≤ 29,0	Отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует				
ПКО Растение (положительный контроль ПЦР)	Ct ≤ 33,0	Ct ≤ 27,0	Ct ≤ 30,0	Ct ≤ 28,0	Ct ≤ 29,5
Амплификатор планшетного типа					
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Ct ≤ 32,5	Отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует				
ПКО Растение (положительный контроль ПЦР)	Ct ≤ 33,0	Ct ≤ 31,5	Ct ≤ 33,0	Ct ≤ 31,0	Ct ≤ 32,5

8.7. Возможные ошибки

8.7.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5.5 определено значение 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.

8.7.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

8.7.3. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора Cy5 значение Ct не определено, либо определено выше граничного Ct, 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 отбор, предварительную подготовку и исследование образца.

8.7.4. 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. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. 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.

9.2. 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.

9.3. 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 Растение и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

10. 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® Растение» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

11. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Дата изготовления



Код партии



Использовать до



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по применению



Не допускать попадания солнечного света



Изготовитель