



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» для
идентификации ГМ сои линий А-5547-127, BPS-CV127, SYНТОН2 в кормах,
пищевой продукции, растительном сырье и посевном материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме
реального времени**

ТУ 21.10.60-333-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение	4
2. Характеристика набора	4
2.1 Принцип действия.....	4
2.2 Состав набора	4
3. Аналитические характеристики.....	6
4. Меры предосторожности.....	6
5. Материалы и оборудование	6
6. Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение проб.....	7
7. Проведение анализа	8
7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб	8
7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР	9
7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией.	10
8. Интерпретация результатов анализа	10
9. Условия транспортирования	12
10. Условия хранения	12
Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).....	13
Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).	18
Приложение 3. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)	20
Приложение 3. Лист вносимых изменений	23

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
ВК-	отрицательный контроль выделения
К-	отрицательный контроль
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота

1. Назначение

Набор предназначен для идентификации генетически модифицированной сои линий А-5547-127, BPS-CV127, SYНТОН2 в кормах, продуктах питания, растительном сырье, посевном материале методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Набор реагентов позволяет специфически амплифицировать фрагменты генома сои линий А-5547-127, BPS-CV127, SYНТОН2 в областях встройки генно-инженерных конструкций в мультиплексном формате. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления 5' концевой метки.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР РВ (Комплект №1) и контрольных образцов (Комплект №2).

Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) Для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы)
- 2) Для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Комплект №1 для проведения ПЦР:

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР СМЕСЬ ГМО-СОЯ-2	прозрачная бесцветная жидкость *	275	550	1
2	Буфер для проведения ПЦР, ПЦР БУФЕР ГМО-СОЯ-2	прозрачная бесцветная жидкость	550	1100	1
3	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	30	60	1
4	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1

Таблица 2. Комплект №2 контрольные образцы:

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)	Прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
2	Положительный контрольный образец, ПКО ГМО-СОЯ-2	Прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

В набор не входят реактивы для экстракции нуклеиновых кислот. Для выделения растительной ДНК рекомендуется использование наборов на основе сорбентного метода (например, «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР», ООО ВЕТ ФАКТОР).

* Возможна легкая опалесценция

3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК млекопитающих, птиц, рыб, а также ДНК нетрансгенных растений.

Предел обнаружения (LOD) — не менее 0,009 % каждой линии в соевой муке.

4. Меры предосторожности

Исследование проводится согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты, 0,2%).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

5. Материалы и оборудование

Для зоны выделения ДНК из исследуемого материала:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вortex (например «ГЭТА-2», «Биоком», Россия);

- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Tarsons», Индия);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Tarsons», Индия);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Axygen», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК (см. пункт 2.2).

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Rotor-Gene Q», Qiagen; «ДТ-96», ДНК-технология или аналогичный).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
- Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2 и 1,5 мл (например, «Axygen», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

6. Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение проб

Материалом для исследования могут служить:

- сырье растительного происхождения;
- корма, соевый шрот;

- посевной материал;
- свежие или высушенные части растений;
- пищевые продукты, содержащие компоненты растительного происхождения;
- биодобавки, содержащие компоненты растительного происхождения

Отбор исследуемых образцов проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов.

От пробы плотной консистенции отбирают на исследование общую пробу весом 10-50 г.

Гранулированную или консервированную продукцию перед исследованием (10-20 г) растирают в ступке до гомогенного состояния. Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 мл.

Лабораторные пробы отбирают на исследование и тестируют в двух повторах. Отбирают лабораторные пробы (20 — 40 мг) в одноразовые микропробирки вместимостью 1,5 мл и направляют на выделения ДНК.

Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение 1 мес (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта. Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре не выше минус 16 °С) в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа).

Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов « ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК (на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например, набор «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР», ООО ВЕТ ФАКТОР);
- проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;
- учет результатов анализа.

7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения ДНК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО (пробирку обозначить как ВК-)**.

Выделять ДНК из анализируемых и контрольных образцов согласно инструкции производителя набора для выделения растительной ДНК.

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО ГМО-СОЯ-2** и ДНК буфера.

Примечание. Допускается размораживание реагентов из набора перед работой при температуре не выше 40°C (с использованием термостата). **Прогревание пробирки TAQ POLYMERASE категорически запрещено.**

В отдельной пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию ПЦР:

- **5 мкл ПЦР СМЕСЬ ГМО-СОЯ-2;**
- **10 мкл ПЦР БУФЕР ГМО-СОЯ-2;**
- **0,5 мкл TAQ POLYMERASE.**

Перемешать смесь на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл ДНК буфера;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);
- в) в пробирку положительный контроль ПЦР (К+) 10 мкл **ПКО ГМО-СОЯ-2.**

Примечание. При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку (например, ДТ-96) **запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!**

7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией.

Параметры температурно-временного режима амплификации на приборах «Rotor-Gene Q», «ДТ-96» и CFX96 указаны в Приложениях 1, 2 и 3 Инструкции соответственно.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя и в соответствии с Приложениями 1, 2 и 3 Инструкции.

В случае использования амплификаторов других моделей рекомендуется консультация со специалистом компании «ВЕТ ФАКТОР».

После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с МУ 1.3. 2569 -09.

8. Интерпретация результатов анализа

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией производителя к прибору и в соответствии с приложениями 1, 2 и 3 к Инструкции.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа.

Проба	Канал детекции			Результат
	FAM/Green	ROX/Orange	Cy5/Red	
	<i>SYNTHON2</i>	<i>BPS-CV127</i>	<i>A-5547-127</i>	
ПКО K ⁺	До 31	До 31	До 31	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
ДНК буфер K ⁻	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Реакция прошла успешно
	Любое значение	Любое значение	Любое значение	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы

Проба	Канал детекции			Результат
	FAM/Green	ROX/Orange	Cy5/Red	
	<i>SYNTHON2</i>	<i>BPS-CV127</i>	<i>A-5547-127</i>	
ОКО ВК-	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Экстракция прошла успешно
	Любое значение	Любое значение	Любое значение	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
Образцы	Любое значение от 1 до 38	Сигнал отсутствует или любое значение	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>Линия SYNTHON2 обнаружена</i>
	Сигнал отсутствует или любое значение	Любое значение от 1 до 38	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>Линия BPS-CV127 обнаружена</i>
	Сигнал отсутствует или любое значение	Сигнал отсутствует или любое значение	Любое значение от 1 до 38	Результат анализа положительный. <i>Линия A-5547-127 обнаружена</i>
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Результат анализа отрицательный

Наличие корректного сигнала по каналам свидетельствует о присутствии ГМ линии сои в исследуемом образце:

1. Канал FAM/Green – SYNTHON2.
2. Канал ROX/Orange – BPS-CV127;
3. Канал Cys5/Red – A-5547-127

Если для исследуемого образца по заданному каналу детекции значение C_t определяется позднее 38 цикла при корректном прохождении положительных и отрицательных контролей – он считается спорным и исследуется повторно с этапа выделения НК. Если при повторной постановке наблюдается схожий результат ($C_t \leq 38$), считают, что данная **ГМ линия не обнаружена**.

ВНИМАНИЕ! При появлении любого значения C_t для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения C_t на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации

9. Условия транспортирования

Набор «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10. Условия хранения

Длительное хранение комплектов набора «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

Перед началом работы с набором компоненты набора следует разукomплектовать и хранить в соответствии со следующими требованиями:

Комплект №1 (см. Табл. 1) при температуре от минус 18 до минус 20°С;

Комплект №2 (см. Табл. 2) при температуре от 2 до 8°С.

11. Срок годности

Срок годности реагентов «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

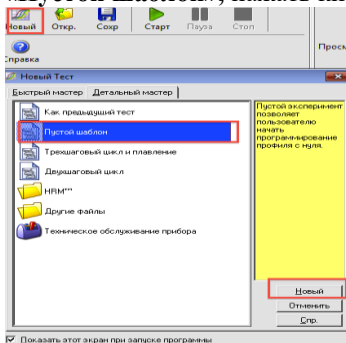
Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

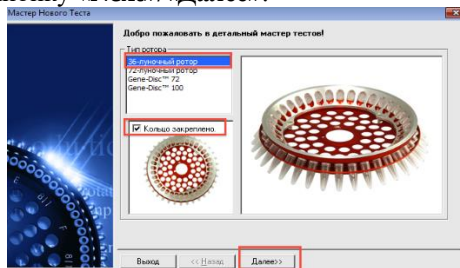
При работе с прибором Rotor-Gene 3000 используют программу Rotor-Gene версии 6 или выше, с приборами Rotor-Gene6000и Rotor-GeneQ– используют программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build67) или выше.

Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «**Rotor-Gene**» 3000 / для англоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» 6000 (Q)/ для русскоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» 6000 (Q).

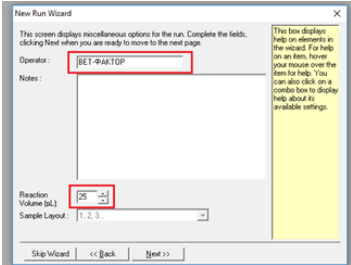
1. Открыть программу «**Rotor Gene Q**».
2. Выбрать в основном меню программы значок «**New**»/«**Новый**». В открывшемся окне выбрать «**Пустой шаблон**», нажать кнопку «**New**»/«**Новый**».



3. Выбрать тип ротора. Например, «**36-Well Rotor**»/«**36-луночный ротор**» при использовании ротора на 36 образцов. Поставить отметку в окошке рядом с надписью «**No Domed 0.2 ml Tubes**»/«**Locking ring attached**»/«**Кольцо закреплено**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».



4. Указать оператора, объем реакционной смеси «**Reaction volume**»/Объем реакции» – 25 мкл. Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко «15 □ oil layer volume»/«15 μL объем масла/воска». Нажать кнопку «Next»/«Далее».



5. В верхней части окна нажать кнопку «**Edit profile**»/«Редактор профиля». В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 4. Нажать клавишу «OK».

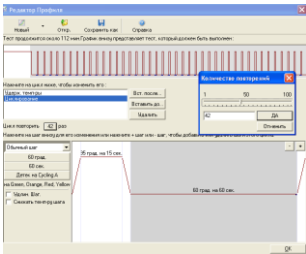
Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации для прибора Rotor-Gene

№	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 3 мин	1
2	95°C – 15 сек	42
	60°C – 60 сек, детекция FAM/Green, ROX/Orange, Cy5/Red	

Для этого требуется проделать следующие шаги:

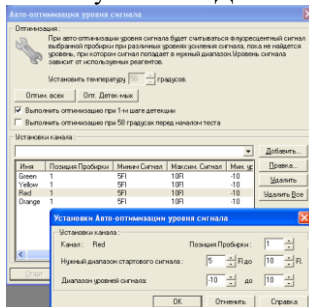
-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New hold at temperature»/«Новое удержание температуры», установить температуру 95°C и время 5 мин в соответствии с пунктом 1 таблицы 4;

-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New cycling»/«Новое циклирование», установить параметры циклирования в соответствии с пунктом 2 таблицы 4.

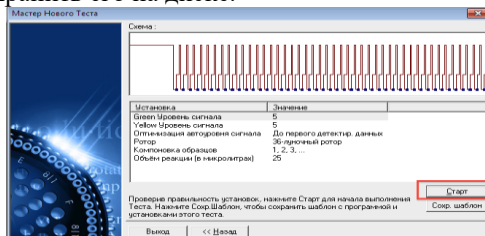


6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку «**Calibrate/Gain Optimisation...**»/«Опт.уровня сигн.». В открывшемся окне

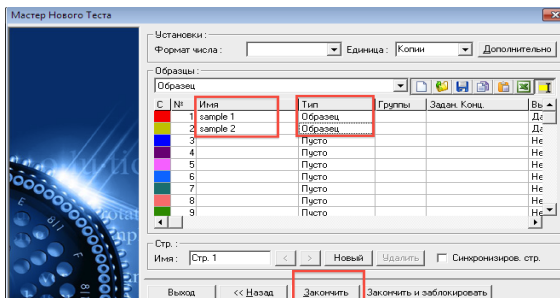
нажать кнопку «**Опт.детек-мыш**». Для всех каналов указать нужный диапазон стартового сигнала: **Min Reading /минимальный сигнал** - 5, **Max Reading /максимальный сигнал** — 10. В графе «**Позиция Пробирки**» указать номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «**усиления сигнала**», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поставить галочкой строку Perform Calibration Before 1st Acquisition «**Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**». Закрыть окно «Авто-оптимизация уровня сигнала». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».



7. Запустить амплификацию кнопкой «**Start run**»/«**Старт**». Дать название эксперимента и сохранить его на диске.



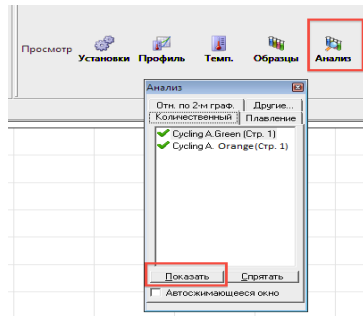
8. После запуска программы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Все пробы и контроли обозначить в меню Тип как **Unknown «Образец»**.



9. После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.

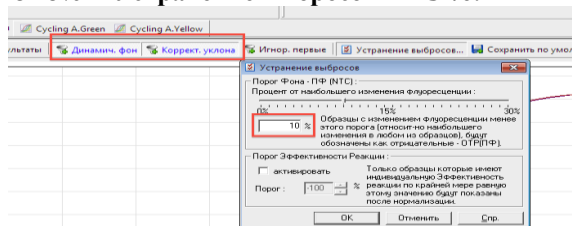
Анализ результатов амплификации для канала FAM/ Green

10. Нажать в меню кнопку «**Analysis**»/«**Анализ**», выбрать режим анализа «**Quantitation**»/«**Количественный**», нажать кнопку «**Cycling A. FAM**»/«**Cycling A. Green**», далее «**Show**»/«**Показать**».



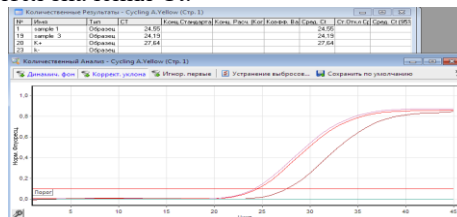
11. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Логарифмическая шкала**).

12. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки **«Dynamic tube»/«Динамич.фон»** и **Slope Correct/«Коррект. уклона»**. Установить More settings/Outlier Removal **«Устранение выбросов»** - 15 %.



13. В меню «CE Calculation». «Вычисление CE» выставить **Thresold.Порог = 0.05.**

14. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.



Анализ результатов амплификации для канала Rox/Orange (ГМ линия BPS-CV127).

19. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange**, далее нажать **Show/Показать**.

20. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Логарифмическая шкала**).

21. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и **Slope Correct**«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» - 15 %.

22. В меню «**CT Calculation**»/«**Вычисление CT**» выставить **Threshold/Порог** =0,05.

23. В таблице результатов (окно «**Quant. Results**»/«**Количественные Результаты**») появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации для канала Cy5/Red (ГМ линия A-5547-127).

24. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. Cy5/Cycling A. Red** далее нажать **Show/Показать**.

25. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Логарифмическая шкала**).

26. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и **Slope Correct**«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» - 15 %.

27. В меню «**CT Calculation**»/«**Вычисление CT**» выставить **Threshold/Порог** =0,05. В таблице результатов (окно «**Quant. Results**»/«**Количественные Результаты**») появятся значения **Ct**.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «**Ct**» для исследуемого образца).

Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

Подготовка к работе

В случае первого использования прибора ДТ-96 или переустановки программы необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР».

1. Открыть программу «RealTime PCR» для прибора ДТ-96.
2. В появившемся окне выбрать «Работа с прибором».
3. В верхней части окна открыть вкладку «Тест» и «Создать/Редактировать тест»:
4. Нажать на кнопку «Создать новый тест» и ввести имя нового теста «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР»:

Нажать «ОК».

5. В появившемся окне задать следующие параметры:

Тип – качественный

Метод – Пороговый (Ct)

Пробирки – образцы

Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл

Флуорофоры – Fam; Rox, Cy5

Создать программу амплификации «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» нажав на иконку .

6. В редакторе программ амплификации выбрать шаблон  и нажать кнопку «Применить».

7. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 5.

Таблица 5 Температурно-временной режим на ДТ-96

№	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 3 мин	1
2	95°C – 15 сек	42
	60°C – 60 сек, детекция FAM, ROX, Cy5	

Нажать «ОК» и сохранить программу под именем «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР». При дальнейшей работе использовать созданную программу.

8. При запуске прибора выбирать «Работа с прибором» и «Добавить тест». В окне добавления теста выбрать «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР».

9. В разделе «1. Образцы» ввести количество образцов включая все контрольные образцы. В разделе «3. Контроли» поставить нули и нажать «ОК».

10. Пользуясь инструкцией к прибору заполнить «Идентификатор пробирки» и «Тип», обращая внимание на порядок заполнения. Нажать кнопку «Применить».

11. Установить пробирки в реакционный блок согласно порядку заполнения и нажать кнопку «Запуск программы». В появившемся окне набрать название протокола и «Сохранить».

12. После завершения реакции можно сразу приступить к анализу результатов, либо при следующей загрузке нажать «Просмотр архива».

13. Далее нажать на иконку с изображением папки  и выбрать файл, в котором был сохранен протокол. Выбрать тип анализа «Ct(Cp) для всех каналов». Метод – «Пороговый (Ct)».

14. В окне справа отобразятся названия образцов и значения пороговых циклов. Выбрать 10%. В позиции **Критерии достоверности данных** ввести: Нижняя граница/порог положительного результата-5%, верхняя граница/порог нормализации данных -30%

Нажать кнопку «Применить».

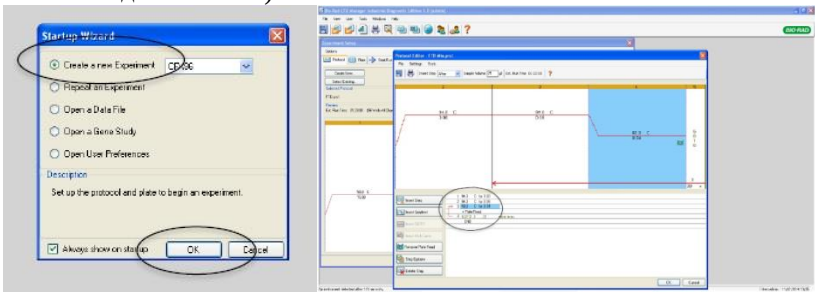
15. Для получения сводного отчета по протоколу необходимо нажать кнопку .

В верхней части окна нажать клавишу «Печать» или «Сохранить», выбрать расширение файла, например *.rtf MS Word, далее «Рабочий стол» ☐ «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» ☐ «Отчеты» ☐ «Год» ☐ «Месяц», в поле «Имя файла» ввести название в форме «год. месяц. число-данные». Нажать сохранить. Нажать клавишу «Заккрыть». Заккрыть или свернуть программу «RealTime PCR».

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 3. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)

- 1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
- 2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).



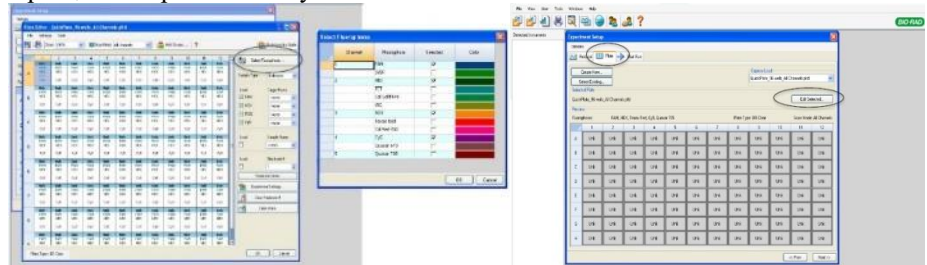
- 3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии параметрами, указанными в таблице 6.

Таблица 6. Температурно-временной режим амплификации на CFX96

№	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 3 мин	1
2	95°C – 15 сек	42
	60°C – 60 сек, детекция FAM, ROX, Cy5	

Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

- 4. Задать схему планшета – расположение пробирок и детекцию флуоресцентного сигнала во всех пробирках по используемым каналам в окне **Plate** модуля **Experiment Setup**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores...**, выбрать галочками флуорофоры **FAM, ROX, Cy5** и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по данным каналам. В окне **Sample name** задать название образцов. Сохранить схему планшета.



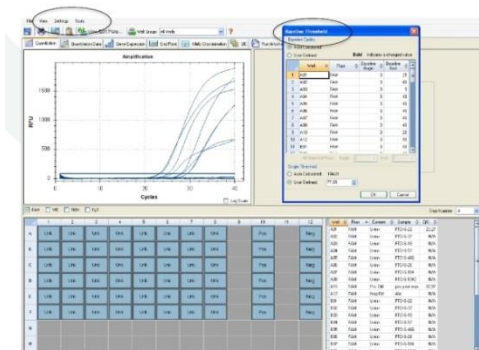
Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» с заданной схемой планшета, нажав кнопку **Start Run**.

6. После окончания выполнения программы можно приступить к анализу результатов с помощью программного обеспечения прибора **CFX96**.

Анализ результатов амплификации для канала Cy5 (A-5547-127).

7. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **Cy5**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции.



Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «K+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «K+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

9. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации для канала ROX (BPS-CV127).

10. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **ROX**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20%** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «K+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным

ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «К+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

11. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения C_t .

Анализ результатов амплификации для канала FAM (SYNTHON2).

12. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **FAM**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20%** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «К+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

13. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения C_t .

14. Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла « C_t » для исследуемого образца.

Приложение 4. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 15.10.2020	По тексту, в т.ч. стр. 2, 10-11, 14-20	Изменены каналы детекции: удален канал JOE(Hex)/Yellow
Версия 1.2 от 01.04.2021	Раздел «Приложения» Инструкции	Добавлено Приложение 3 «Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)»
Версия 1.3 от 29.09.2022	Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	Геометрический (Cp) метод обработки данных заменён на пороговый (Ct)

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» или по вопросам приобретения тест-систем нашего производства просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:

108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: vet@faktor.ru