

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель директора

ФГУП «ВНИИМС» по науке

Ф.В. Булыгин

2018 г.



Модули реакционные оптические CFX96 в составе термоциклеров для амплификации нуклеиновых кислот C1000 Touch

Методика поверки

МП 009-14-18

г. Москва, 2018 г.

Настоящая методика распространяется на Модули реакционные оптические CFX96 в составе термоциклеров для амплификации нуклеиновых кислот C1000 Touch (далее – модули) изготавливаемые Bio-Rad Laboratories Inc., США, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, USA на заводе Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., Сингапур, 1 Kaki Bukit View #03-01, Techview, 415941, Singapore, и устанавливает методику их первичной и периодической поверки.

Интервал между поверками – 1 год.

1 ОПЕРАЦИИ ПОВЕРКИ

1.1 При проведении поверки выполняют операции, указанные в таблице 1.

Таблица 1

Наименование операции	Номер пункта методики	Проведение операции при	
		первичной поверке	периодической поверке
1 Внешний осмотр	7.1	да	да
2 Опробование	7.2	да	да
3 Проверка идентификационных данных ПО	7.3	да	да
4 Определение метрологических характеристик	7.4	да	да

2 СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

При проведении поверки применяют следующие материалы и реактивы:

2.1. Государственный стандартный образец № 9866-2011 состава ДНК сои (комплект ГМ-СОЯ-ВНИИМ). Нормированная метрологическая характеристика ГСО – массовая доля ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои с границами относительной погрешности (при $P = 0,95$) ± 12 %.

2.2 Набор для идентификации линии (трансформационного события) GTS 40-3-2 генетически модифицированной (ГМ) сои в продуктах питания, пищевом сырье, семенах и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) «Соя GTS 40-3-2 идентификация» по ГОСТ Р 57175-2016.

2.3. Вода деионизированная, ГОСТ Р 52501-2005.

2.4. Вспомогательные средства

- дозаторы пипеточные по ГОСТ 28311-89 одноканальные с варьируемым объемом дозирования

(2 - 20) мм³ с шагом 0,01 мм³, с точностью $\pm 0,8\%$;

(20 - 200) мм³ с шагом 0,1 мм³, $\pm 0,6\%$;

(100 - 1000) мм³ с шагом 1 мм³, $\pm 3\%$;

– ПЦР плашки на 96 лунок, стрипы 0,2 мл, пробирки 0,2 мл, штатив для микропробирок 0,2 мл;

– пластиковые полипропиленовые или стеклянные пробирки объемом не менее 1,5 мл;

– центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400 или аналогичная.

Допускается применение аналогичных средств поверки, обеспечивающих определение метрологических характеристик поверяемых СИ с требуемой точностью.

Все используемые средства измерений должны иметь действующие свидетельства о поверке.

3. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ПОВЕРИТЕЛЕЙ

К проведению поверки персонал, прошедший специальный инструктаж и имеющий опыт проведения ПЦР. Для получения данных по поверке допускается участие операторов, обслуживающих прибор (под контролем поверителя).

4 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

4.1. Требования безопасности должны соответствовать рекомендациям, изложенным в руководстве по эксплуатации на прибор.

4.2. При выполнении поверки соблюдают правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76, требования электробезопасности по ГОСТ 12.1.019-79 и пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004-91.

4.3. По окончании амплификации отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

5 УСЛОВИЯ ПОВЕРКИ

При проведении поверки в лаборатории должны соблюдаться следующие нормальные условия измерений:

- температура окружающей среды, °С20±5
- относительная влажность воздуха,%, не болееот 30 до 80
- напряжение переменного тока, В.....220 ± 22
- содержание вредных веществ в воздухе в месте проведения поверки не должно превышать предельно допустимых концентраций по ГОСТ 12.1.005-88.

В помещении, где производится поверка, не должно быть повышенных уровней электромагнитного излучения, шума и вибрации. Не допускается попадание на ПЦР-анализатор прямых солнечных лучей.

6 ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ

6.1 Подготовить прибор к работе в соответствии с требованиями руководства по эксплуатации.

6.2 Подготовить наборы реагентов в соответствии с их инструкциями по применению.

- 6.3. Подготовить пробирку (1,5 мл или более) для приготовления реакционного раствора;
- 6.4. Подготовить и подписать 3 микропробирки (0,5 мл или более) для приготовления разбавлений (К2, К3 и К4);
- подготовить ПЦР-плашку на 96 лунок или 6 ПЦР-стрипов 0,2 мл или 34 ПЦР-пробирки 0,2 мл.*

* Количество стрипов или пробирок указано исходя из 6-кратного дублирования для каждого из 4-х контрольных растворов и одного исследуемого образца и 4-х кратного дублирования для отрицательного контрольного образца, рекомендуется использовать низкопрофильный пластик

** Допускается другое число повторных разведений, но не менее 3-х для каждого из разбавлений и образцов.

6.5. Реакционный раствор.

Для приготовления реакционного раствора используется набор реагентов «Соя GTS 40-3-2 идентификация». Суммарный минимально необходимый объем реакционного раствора рассчитывается по следующей формуле:

$21 \times (N+1)$ мкл реакционной смеси «Соя GTS 40-3-2» + $0,5 \times (N+1)$ мкл Taq ДНК-полимеразы, где N – количество исследуемых проб (число реакций).

Для одной реакции используется 20 мкл реакционного раствора.

Приготовление реакционного раствора:

6.5.1. Разморозить пробирки с реакционной смесью «Соя GTS 40-3-2», выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на центрифуге-вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель.

6.5.2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера (1,5 мл или более) смешать 735 мкл реакционной смеси «Соя GTS 40-3-2» и 17,5 мкл SynTaq ДНК-полимеразы.

6.5.3. Полученный раствор перемешать на центрифуге-вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд.

Примечание. Данные объемы указаны исходя из 6-кратного дублирования для каждого из 4-х контрольных растворов и одного исследуемого образца и 4-кратного дублирования для отрицательного контрольного образца (всего 34 реакции).

6.6. Контрольные растворы.

Для приготовления контрольных растворов используется ГСО «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-5» и его последовательные разведения в деионизированной воде. Для построения калибровочных кривых используются следующие контрольные растворы:

Таблица 2.

	Описание	Число молекул в 5 мкл, условно	
		Натур. Соя	ГМ соя
K1	«ГМ-СОЯ-ВНИИМ-5»	1000	50
K2	«ГМ-СОЯ-ВНИИМ-5», разведенный водой в пропорции 1:2 (в 3 раза)	333	16,7
K3	K2, разведенный водой в пропорции 1:2 (в 3 раза)	111	5,56
K4	K3, разведенный водой в пропорции 1:2 (в 3 раза)	37	1,85

Приготовление контрольных растворов:

6.6.1. Разморозить пробирку ГСО № 9866-2011 «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-5», выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на центрифуге-вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель.

6.6.2. Подготовить 3 чистые пробирки подходящего размера для приготовления разбавлений ГСО «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-5» (Пробирки обозначим, как К2, К3 и К4).

6.6.3. В пробирке К2 смешать 16 мкл ГСО «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-5» и 32 мкл деионизированной воды, полученный раствор перемешать на центрифуге-вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд.

6.6.4 В пробирке К3 смешать 16 мкл раствора из пробирки К2 и 32 мкл деионизированной воды, полученный раствор перемешать на центрифуге-вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд.

6.6.5. В пробирке К4 смешать 16 мкл раствора из пробирки К3 и 32 мкл деионизированной воды, полученный раствор перемешать на центрифуге-вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд.

Примечание. Данные объемы указаны исходя из 6-кратного дублирования для каждого из 4-х реакционных растворов.

6.7. Подготовка отрицательного контроля и исследуемого образца:

6.7.1. Разморозить пробирку отрицательного контрольного образца (ОКО) из набора «Соя GTS 40-3-2 идентификация», выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на центрифуге-вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель.

6.7.2. Разморозить пробирку ГСО № 9866-2011 «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1» (С1, исследуемый образец), выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на центрифуге-вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель.

7 ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ

7.1 Внешний осмотр

При внешнем осмотре устанавливают:

- соответствие комплектности модулей требованиям технической документации;
- четкость маркировки;
- исправность механизмов и крепежных деталей.

Не допускаются дефекты, которые могут повлиять на работоспособность прибора.

7.2 Опробование

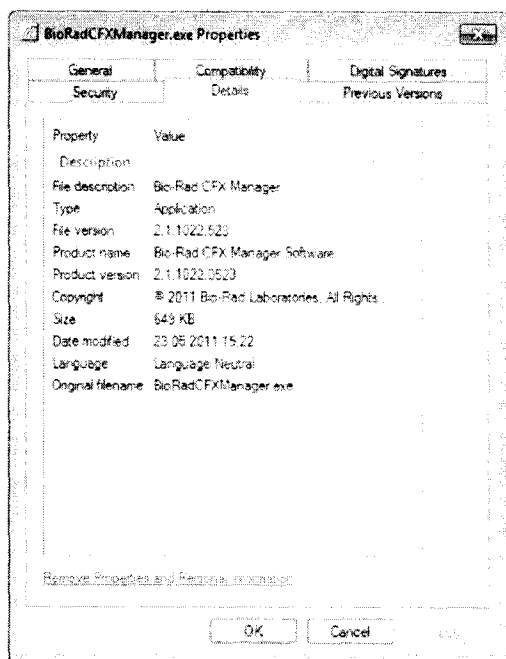
Включить прибор, подготовить его к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации, прогреть не менее 30 мин.

7.3. Проверка ПО

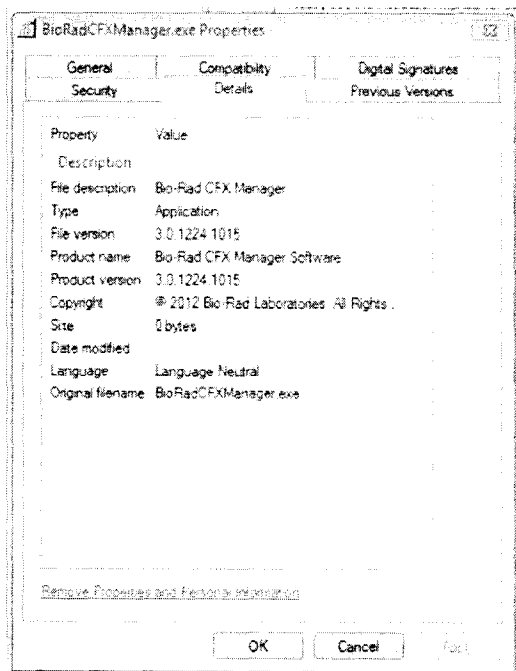
7.3.1. Проверка идентификационных данных программного обеспечения

Идентификационные сведения отображаются на вкладке «Details»:

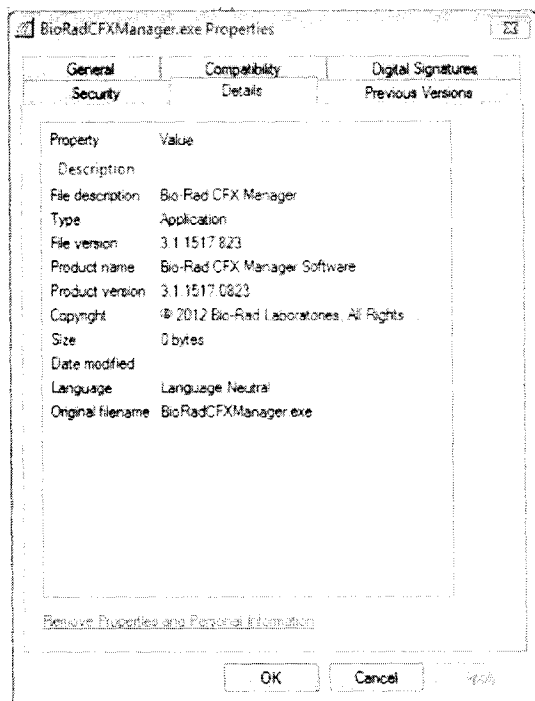
CFX Manager 2.1



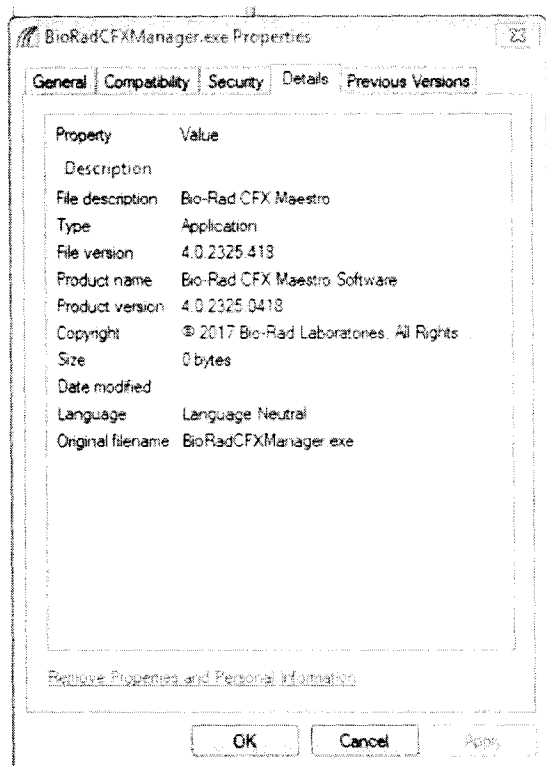
CFX Manager 3.0



CFX Manager 3.1



CFX Maestro 1.0



Bio-Rad CFX Maestro 1.1

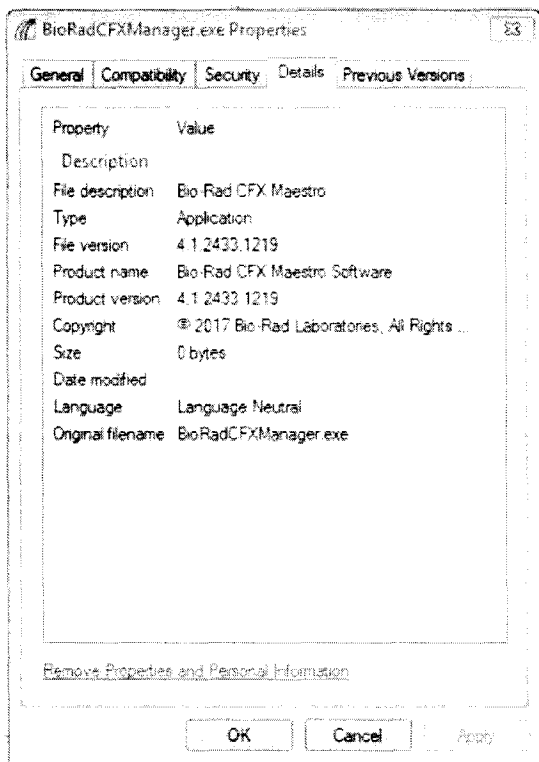


Рис.1 Окна с названием и номером версии ПО

7.3.2 Проверка контрольной суммы файла **BioRadCFXManager.exe** осуществляется по алгоритму MD5.

Для расчета контрольной суммы используется программа HashTab версии 6.0.0 или выше, или аналогичная.

При использовании программы HashTab порядок действий следующий:

- в папке, в которой находятся файлы программы, найти файл **BioRadCFXManager.exe** и установить на него курсор;
- нажать правую кнопку мыши и выбрать пункт «свойства»;
- в открывшемся окне выбрать закладку «File Hashes», в которой выбрать строку MD5;
- из указанной строки считать значение хеш-суммы (цифрового идентификатора ПО).

Совпадение идентификационных данных запущенного ПО с данными, приведенными в таблице 6 является положительным результатом проверки идентификационных данных ПО.

Таблица 3 - Идентификационные данные программного обеспечения

Идентификационные данные (признаки)	Значение	Значение	Значение	Значение	Значение
Идентификационное наименование программного обеспечения	Bio-Rad CFX Manager Software	Bio-Rad CFX Manager Software	Bio-Rad CFX Manager Software	Bio-Rad CFX Maestro Software	Bio-Rad CFX Maestro Software
Номер версии (идентификационный номер)	2.1	3.0	3.1	4.0	Не ниже 4.1
Цифровой идентификатор ПО	E8FCF9BB 13DB9514 8C9BAF82 10D0F6E1	45378A155 3AFCCE41 FBDF7DE FDE8C4A 9	92EC0119 418269654 E03F4A1B 856A40F	AB3BC93 EC7FFDD 4A7B1F39 BFA262A EB3	AB3BC9 3EC7FFD D4A7B1F 39BFA26 2
Алгоритм вычисления цифрового идентификатора ПО	MD5	MD5	MD5	MD5	MD5

7.4 Определение метрологических характеристик

7.4.1. В каждую анализируемую лунку ПЦР-плашки (пробирку/лунку стрипа) внести 20 мкл реакционного раствора и 5 мкл образца/контрольного раствора/отрицательного контроля.

7.4.2. Исследуемую плашку (пробирки/стрипы) плотно закрыть, центрифугировать для сброса капель и установить в реакционный модуль прибора. Записать и сохранить информацию о позициях проб в реакционном модуле.

7.4.3. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детектирования флуоресцентного сигнала и провести ПЦР-реакцию в режиме реального времени:

В меню **File** выбрать **New** → **Protocol**. В появившемся окне задать циклограмму со следующими параметрами:

Sample Volume 25 µl

1. 95,0 C for 5:00

2. 95,0 C for 0:15

3. 59,0 C for 0:40

+Plate read

4. GOTO 2, 49

END

Нажать **OK** и сохранить протокол на компьютере в удобной рабочей папке.

7.4.4. Внести сведения об образцах и красителях. Для этого во вкладке **Plate** выбрать опцию **Create New**. Нажать кнопку **Select Fluorophores**. В появившемся окне выбрать красители **HEX, ROX**. Нажать **OK**. Обозначить на плашке месторасположение образцов (рекомендуемое расположение образцов в лунках показано на рисунке 1):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						K2	K3	K4				
B						K2	K3	K4				
C						K2	K3	K4	OKO			
D						K2	K3	K4	OKO			
E						K2	K3	K4	OKO			
F						K2	K3	K4	OKO			
G												
H												

Рисунок 2. Рекомендуемое расположение образцов.

7.4.5. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с первым контрольным раствором (K1), и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Standard**. Задать измерение сигнала по выбранным красителям, поставив галочки в колонке **Load** напротив названий всех выбранных в п.6 красителей. Задать номер стандарта, выбрав **1** в графе **Replicate #** и поставив галочку в колонке **Load** напротив данной графы. В графе **Concentration** выбрать **<HEX>**, ввести условное число молекул ДНК **1000**. В графе **Concentration** выбрать **<ROX>**, ввести **50**.

7.4.6. Повторить то же самое для контрольных растворов K2, K3 и K4, вводя условное число молекул ДНК согласно таблице ниже. (В графе **Replicate #** выбирать, соответственно, **2, 3 и 4**).

Таблица 4

Наименование		Условное число молекул ДНК (Concentration)	
в методике	в ПО CFX	HEX (Соя вся)	ROX (Соя ГМ)
K1	Std-1	1000	50
K2	Std-2	333	16.7
K3	Std-3	111	5.56
K4	Std-4	37	1.85
C1	Unk-1	-	-

ОКО	NTC	-	-
-----	-----	---	---

7.4.7. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с ОКО, в графе **Sample Type** выбрать **NTC**. Задать измерение сигнала по выбранным красителям, поставив галочки в колонке **Load** напротив названий всех выбранных в п.б красителей. Задать номер контроля, выбрав **1** в графе **Replicate #** и поставив галочку в колонке **Load** напротив данной графы.

7.4.8. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с неизвестным образцом С1, в графе **Sample Type** выбрать **Unknown**. Задать измерение сигнала по выбранным красителям, поставив галочки в колонке **Load** напротив названий всех выбранных в п.б красителей. Задать номер образца, выбрав **1** в графе **Replicate #** и поставив галочку в колонке **Load** напротив данной графы.

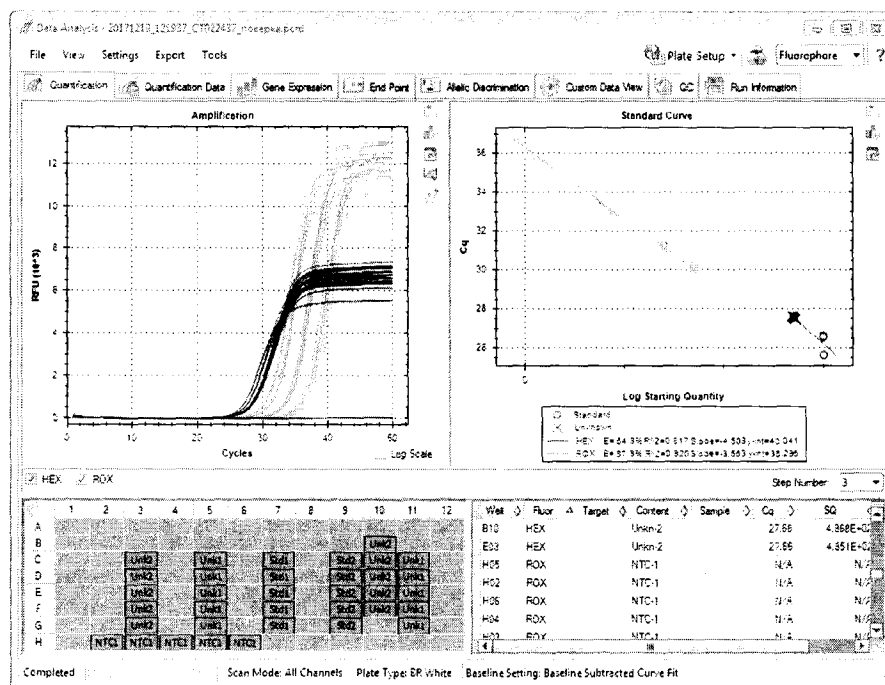
7.4.9. Нажать **ОК**. Дать имя плашке с указанием даты эксперимента и сохранить полученный файл на компьютере в удобной рабочей папке.

7.4.10 Начать работу прибора. Для этого выбрать закладку **Start Run**, в которой нажать клавишу **Start Run**. Задать имя будущего файла результатов с указанием даты проведения эксперимента. Сохранить файл на компьютере в удобной рабочей папке.

Зафиксировать в рабочем журнале название файла. После завершения амплификации провести обработку и сохранение данных.

7.4.11. Обработка результатов анализа

После завершения амплификации программа «**CFX Manager Software**» («**CFX Maestro Software**») откроет окно «**Data Analysis**». Открыть данное окно также можно, выбрав в основном меню программы **File**→**Open**→**Data File...** и указав необходимый файл результатов.



Установить расчет результатов анализа методом **Regression**. Для этого в меню **Settings** выбрать **Cq Determination Mode**→**Regression**.

7.4.12. Убедиться, что результаты анализа подлежат учету

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала NTC по каналу HEX и/или ROX (ложноположительный результат всего эксперимента);
- в случае регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу ROX одновременно с отсутствием роста сигнала по каналу HEX (ложноположительный результат в конкретной пробирке);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу HEX (ложноотрицательный результат в конкретной пробирке);
- в случае отсутствия роста сигнала Std-n по каналам HEX и/или ROX (ложноотрицательный результат всего эксперимента).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала в пробирках с исследуемым образцом по каналу HEX;
- в случае отсутствия роста сигнала флуоресценции NTC по каналам HEX и ROX;
- в случае регистрации роста сигнала Std-i по каналам HEX, ROX одновременно.
- Примечание. В случае если результаты анализа не подлежат учету (Приложение 2, п.1) следует повторить постановку ПЦР, обращая внимание на тщательное приготовление растворов. По возможности, использовать набор «Соя GTS 40-3-2 идентификация» из другой партии.

7.4.13. Убедитесь, что коэффициенты корреляции калибровочных графиков (величины R^2 на панели **Standard Curve**) составляют не менее 0,95.

Примечание. Допускается исключение из анализа некоторых лунок при условии, что число повторов данного образца, учитываемых при анализе, будет не менее 3-х. Чтобы исключить ячейку из анализа необходимо щелкнуть правой кнопкой мыши по исключаемой ячейке и в появившемся меню выбрать **Well Xx→Exclude from Analysis**.

7.4.14. В окне “**Data Analysis**” открыть закладку “**Quantification Data**”. Щелкнув правой кнопкой мыши по таблице результатов (“**Results**”), выбрать “**Sort...**”. В появившемся окне выбрать **Sort by: Content** и **Then by: Fluor**. Нажать “**OK**”.

Щелкнув правой кнопкой мыши по таблице результатов (“**Results**”), выбрать “**Select Columns...**”. В появившемся окне выбрать только **Fluor**, **Content** и **SQ Mean** (Starting Quantity Mean – среднее значение исходной концентрации ДНК). Нажать “**OK**”.

Fluor	Content	SQ Mean
ROX	Std-1	5.00E+01
ROX	Std-1	5.00E+01
ROX	Std-1	5.00E+01
HEX	Std-2	5.00E+02
HEX	Std-2	5.00E+02
HEX	Std-2	5.00E+02
ROX	Std-2	2.50E+01
ROX	Std-2	2.50E+01
ROX	Std-2	2.50E+01
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
HEX	Unkn-1	5.09E+02
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00
ROX	Unkn-1	5.85E+00

Для Unkn-1 записать значения *SQ Mean* для каналов ROX и HEX.

Примечание. Запись “ $E \pm xx$ ” в таблице результатов означает “10 в степени $\pm xx$ ”, например $5.85E+00 = 5,85$.

7.4.15. Сохранить отчет о результатах анализа (в формате PDF). Для этого в окне “**Data Analysis**” выбрать **Tools→Reports...**, **File→Save**.

Примечание. Сохранить результаты анализа в распространенных форматах можно, воспользовавшись функцией экспорта (“**Export**”) программного обеспечения “**CFX Manager Software /Maestro Software**”.

7.4.16. Провести расчет измеренной массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в ГСО «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1» по формуле

$$K_{\text{изм}} \left[\frac{\Gamma}{\text{КГ}} \right] = 1000 \times \frac{SQMean(ROX)}{SQMean(HEX)}$$

Относительная погрешность измерений массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в ГСО «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1» рассчитывается по формуле

$$\delta[\%] = \frac{|K_{\text{изм}} - K_{\text{спец}}|}{K_{\text{спец}}} \times 100\%,$$

где $K_{\text{спец}}$ – среднее паспортное значение массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в ГСО «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1».

Прибор считается прошедшим поверку, если относительная погрешность определения массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в образце «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1» не превышает 30 %.

8 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

8.1 Результаты поверки заносят в протокол.

8.2 Положительные результаты поверки оформляют выдачей свидетельства по форме, установленной приказом Минпромторга РФ № 1815 от 02.07.2015.

8.3 Модули, не удовлетворяющие требованиям настоящих рекомендаций, к эксплуатации не допускаются. Модули изымают из обращения. Свидетельство о поверке изымают и выдают извещение о непригодности.

8.4 После ремонта средства измерений подвергают поверке.

8.5 Знак поверки наносится на свидетельство о поверке.

Начальник лаборатории 009 ФГУП «ВНИИМС»



Е.В. Кулябина