


УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора ФГУП «ВНИИМС»
по производственной метрологии


Н.В. Иванникова

12
_____ 2019 г.



Амплификаторы ДНК с регистрацией результатов в режиме реального
времени Индикатор-БИО

Методика поверки

009-22-19 МП

г. Москва

2019 г.

Настоящая методика распространяется на Амплификаторы ДНК с регистрацией результатов в режиме реального времени Индикатор-БИО (далее – модули) изготовленные ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1 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 | | |

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 и количественного анализа 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 количество» по ГОСТ Р 57175-2016.

2.3. Вода деионизированная, ГОСТ Р 52501-2005.

2.4. Вспомогательные средства

–дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема 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 микро-пробирок 0,2 мл;

–картридж одноразовый пластиковый для проведения реакции по ТУ 9443-004-96301278-2019;

–центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400 или аналогичная.

Допускается применение других средств измерений, оборудования, реактивов с техническими и метрологическими характеристиками не хуже указанных.

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. Подготовка стандартных образцов: разморозить пробирку ГСО № 9866-2011 «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-5», выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на встряхивателе и центрифугировать при 10000 g в течение 5 секунд для сброса капель.

6.4. Приготовление реакционной смеси для измерения содержания ГМ сои в ГСО:

В качестве набора 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 используются реагенты из набора «КВАНТУМ П СОЯ» (ДНК Технология, Россия), представленные в таблице 2.

При приготовлении реакционной смеси объем рассчитывается как $(N+88)$, где N – объем ячейки чипа, $N = 52$ мкл.

В пробирку последовательно добавляются компоненты в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 Реакционная смесь, $V = 140$ мкл.

| № п.п. | Компонент | Стоковая концентрация | Финальная концентрация на реакцию | Количество на реакцию (общий объем 140 мкл), мкл |
|--------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|
|--------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|

| | | | | |
|----|--------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------|------|
| 1 | Вода | - | - | 85,2 |
| 2 | Буфер PCRБ | 10X | 1X | 14 |
| 3 | dNTP's | 25 ммоль | 0,5 ммоль | 2,8 |
| 4 | Праймер 35s-s3 | 10 пмоль/мкл* | 0,286 пмоль/мкл | 4 |
| 5 | Праймер 35s-a3 | 10 пмоль/мкл* | 0,286 пмоль/мкл | 4 |
| 6 | Зонд 35s-pt3 | 10 пмоль/мкл* | 0,286 пмоль/мкл | 4 |
| 7 | Праймер gm1-r | 10 пмоль/мкл* | 0,286 пмоль/мкл | 4 |
| 8 | Праймер gm2-f2 | 10 пмоль/мкл* | 0,286 пмоль/мкл | 4 |
| 9 | Зонд gm2-pt2 | 10 пмоль/мкл* | 0,286 пмоль/мкл | 4 |
| 10 | Фермент Таq полимераза | 0,083 мккат/мкл | 0,001 мккат/мкл | 2 |
| 11 | Калибровочный раствор/ исследуемый стандартный образец | - | - | 12 |

* Для удобства проведения реакции, поставляемые праймеры и зонды разбавляются в воде до концентрации 10 пмоль/мкл.

Реакционную смесь готовят непосредственно перед каждым измерением.

В приготовленную реакционную смесь добавляют по 12 мкл калибровочного раствора, либо измеряемого СО в расчете на 140 мкл реакционной смеси.

После приготовления реакционной смеси необходимо залить часть объема этой смеси в одноразовый картридж шприцом, избегая образования пузырей на поверхности внутри ячейки чипа между пленкой и пластиком. Заправка картриджа осуществляется только при использовании одноразовых игл и шприцов. При заправке картриджа необходимо проткнуть герметик с двух сторон при этом, после чего необходимо продуть иглы при помощи шприца на 6 мл.

– 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 аттестованные растворы:

Таблица 2.

| № обр. | Описание |
|--------|----------|
| К1 | ГМО 5% |
| К2 | ГМО 5% |
| К3 | ГМО 5% |

| | |
|----|----------|
| К4 | ГМО 1% |
| К5 | ГМО 1% |
| К6 | ГМО 1% |
| К7 | ГМО 0,1% |
| К8 | ГМО 0,1% |
| К9 | ГМО 0,1% |

7 ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ

7.1 Внешний осмотр

При внешнем осмотре устанавливают:

– соответствие комплектности амплификаторов 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 о программном обеспечении отображаются на мониторе СИ должны соответствовать приведенным в таблице:

| Идентификационное наименование программного обеспечения | Номер версии (идентификационный номер) | Цифровой идентификатор ПО | Алгоритм вычисления цифрового идентификатора ПО |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Индикатор БИО | Не ниже 1.1 | a44b2d5a8b13d3e40189 a4c0a2a6d55ab897c33e | SHA1 |

7.4. Определение метрологических характеристик

7.4.1. Залить часть объема реакционной смеси в одноразовый картридж шприцом, избегая образования пузырей на поверхности внутри ячейки чипа между пленкой и пластиком. Заправка картриджа осуществляется только при использовании

одноразовых игл и шприцов. При заправке картриджа необходимо проткнуть герметик с двух сторон при этом, после чего необходимо продуть иглы при помощи шприца на 6 мл.

7.4.2 Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детектирования флуоресцентного сигнала и провести ПЦР-реакцию в режиме реального времени. Программу установить в соответствии с таблицей 4. Внести сведения об образцах и красителях. Начать работу прибора. После завершения амплификации провести обработку и сохранение данных.

Таблица 4

| № блока | Температура, °С | минут | секунд | Число циклов | Режим оптических измерений, FAM, HEX | Тип блока |
|---------|-----------------|-------|--------|--------------|--------------------------------------|-----------|
| 1 | 94 | 3 | 0 | 1 | | |
| 2 | 94 | 0 | 10 | 50 | | цикл |
| | 64 | 0 | 20 | | + | |

7.4.3. Обработка результатов анализа

Убедиться, что результаты анализа подлежат учету.

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирке с исследуемым образцом по каналу FAM (ложноотрицательный результат в конкретной пробирке);
- в случае отсутствия роста сигнала по каналам HEX и/или FAM (ложноотрицательный результат всего эксперимента).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала в пробирках с исследуемым образцом и калибровочных образцах по каналу FAM;

Примечание. В случае если результаты анализа не подлежат учету следует повторить постановку ПЦР, обращая внимание на тщательное приготовление растворов. По возможности, использовать набор для идентификации линии из другой партии.

Построение калибровочной кривой.

По результатам измерений калибровочных растворов заполнить таблицу №5 и построить калибровочную прямую отдельно для каждого вида сои (натуральной и генно-модифицированной). Так что по оси абсцисс откладываются значения логарифма условной концентрации ДНК сои в соответствующем разведении калибровочного раствора ($\log_2(C_i)$), а по оси ординат измеренное значение C_p соответствующего раствора.

Таблица 5

| № обр. | Описание | Значение цикла, Ср | | ΔC (FAM-HEX) | ΔC среднее |
|-----------|----------|--------------------|-----|----------------------|--------------------|
| | | FAM | HEX | | |
| K1 | ГМО 5% | | | | |
| K2 | ГМО 5% | | | | |
| K3 | ГМО 5% | | | | |
| K4 | ГМО 1% | | | | |
| K5 | ГМО 1% | | | | |
| K6 | ГМО 1% | | | | |
| K7 | ГМО 0,1% | | | | |
| K8 | ГМО 0,1% | | | | |
| K9 | ГМО 0,1% | | | | |

По калибровочной кривой определить коэффициенты a и b (исходя их уравнения прямой $y=ax+b$). В ПО Microsoft Excel калибровочная прямая может быть построена как линия тренда по имеющимся точкам, как показано на рисунке 1. Калибровочные прямые могут быть приняты, только в случае, если коэффициенты корреляции калибровочных графиков (величины R^2) составляют не менее 0,95.

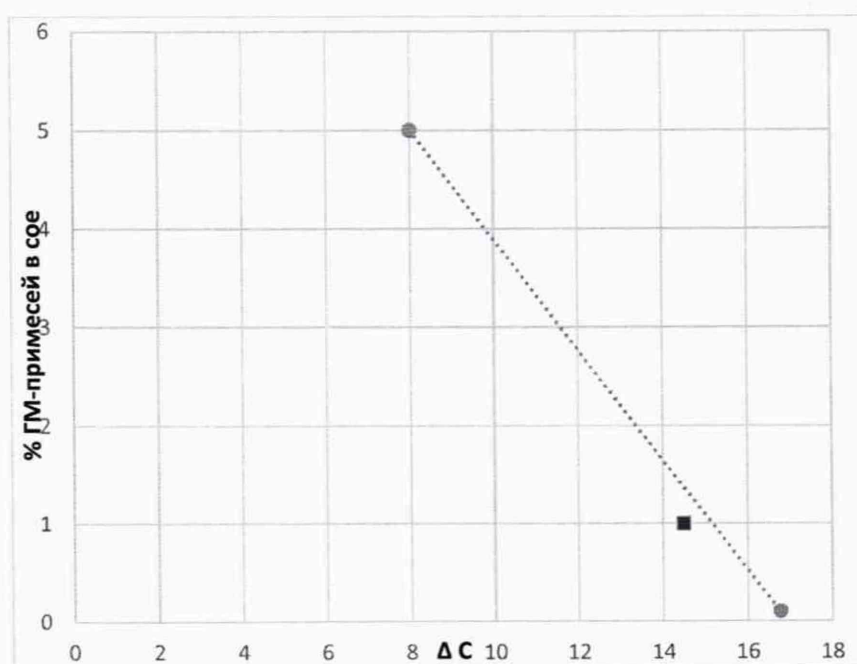


Рисунок 1

После чего рассчитать логарифм концентрации ($\log_2(C)$) натуральной и генномодифицированной сои по соответствующим калибровочным прямым для измеряемого стандартного образца (1%), по формулам:

$$\log_2(C_{HEX}) = \frac{Cp_{CO}(HEX) - b}{a} \dots\dots\dots(1)$$

$$\log_2(C_{FAM}) = \frac{Cp_{CO}(FAM) - b}{a} \dots\dots\dots(2)$$

$$C_{HEX} = 2^{\log_2(C_{HEX})} \dots\dots\dots(3)$$

$$C_{FAM} = 2^{\log_2(C_{FAM})} \dots\dots\dots(4)$$

$$C_{изм} = \frac{C_{FAM}}{C_{HEX}} \cdot 100\% \dots\dots\dots(5)$$

Относительная погрешность измерений массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в ГСО «ГМ-СОЯ-ВНИИМ-5» рассчитывается по формуле:

$$\delta[\%] = \frac{|C_{изм} - C_{пасп}|}{C_{пасп}} \cdot 100\% \dots\dots\dots(6)$$

где $C_{пасп}$ – 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