



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ
В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И
ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ»
(ФГБУ «ВНИИИМТ» РОСЗДРАВНАДЗОРА)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора
ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора

Р.Н. Кашапов



«14» июня 2024 г.

Государственная система обеспечения единства измерений

Анализаторы генетические капиллярного электрофореза LOCUS Seqtor 1616

Методика поверки

ИМТ-МП-0044-2024

г. Москва
2024 г.

1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1 Настоящая методика поверки распространяется на анализаторы генетические капиллярного электрофореза LOCUS Seqtor 1616 (далее по тексту – анализаторы), изготовленные ООО «НПФ Хеликон», г. Москва, и устанавливает порядок и объём их первичной и периодической поверки.

1.2 Используемые средства поверки обеспечивают прослеживаемость анализаторов к гэт208-2024 согласно государственной поверочной схеме, утвержденной Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10.06.2021 № 988 «Об утверждении Государственной поверочной схемы для средств измерений содержания органических и элементоорганических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах».

1.3 Метод, обеспечивающий реализацию методики поверки – метод прямых измерений.

1.4 Проверка анализатора должна проводиться в соответствии с требованиями настоящей методики поверки.

1.5 В результате поверки должны быть подтверждены метрологические требования, приведенные в Приложении А.

2 ПЕРЕЧЕНЬ ОПЕРАЦИЙ ПОВЕРКИ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

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

Таблица 1 – Операции поверки

Номер раздела (пункта) методики проверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки	Наименование операции	Обязательность выполнения операций поверки при	
		первой проверке	периодической проверке
7	Внешний осмотр средства измерений	Да	Да
8	Подготовка к проверке и опробование средства измерений	Да	Да
9	Проверка программного обеспечения средства измерений	Да	Да
10	Определение метрологических характеристик средства измерений	Да	Да
11	Подтверждение соответствия средства измерений метрологическим требованиям	Да	Да

3 ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

3.1 При проведении поверки должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды, °С от +15 до +25
 - относительная влажность воздуха, % от 40 до 80
 - атмосферное давление, кПа от 85 до 106

4 ТРЕБОВАНИЯ К СПЕЦИАЛИСТАМ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИМ ПОВЕРКУ

4.1 К поверке анализаторов допускаются специалисты, изучившие эксплуатационные документы на поверяемые средства измерений, средства поверки, настоящую методику поверки.

4.2 Минимальное количество специалистов для выполнения данной методики поверки – один.

4.3 К проведению поверки допускаются лица, соответствующие требованиям, изложенным в статье 41 Приказа Минэкономразвития России от 26.10.2020 года № 707 (ред. от 30.12.2020 года) «Об утверждении критериев аккредитации и перечня документов, подтверждающих соответствие заявителя, аккредитованного лица критериям аккредитации».

4.4. Для получения данных допускается участие операторов, обслуживающих анализаторы (под контролем поверителя).

5 МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ПОВЕРКИ

Таблица 2 – Средства поверки

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
Основные средства поверки		
р. 10 Определение метрологических характеристик	Стандартный образец инактивированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2, Интервал аттестованных значений массовых долей аденина от 28,82 % до 29,75 %, массовых долей гуанина от 20,85 % до 24,12 %, массовых долей цитозина от 17,00 % до 20,04 %, массовых долей тимина от 29,00 % до 30,29 %, с границами допускаемых значений относительной погрешности аттестованного значения СО ($P=0,95$) $\pm 0,5\%$	Стандартный образец инактивированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2, рег. № ГСО 11661-2020
Вспомогательные средства поверки		
р. 8 Контроль условий поверки (при подготовке к поверке и опробовании средства измерений)	Диапазон измерений температуры окружающей среды от +10 °C до +30 °C, пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений ± 2 °C, диапазон измерений относительной влажности от 20 % до 85 %, пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений ± 3 %, диапазон измерений абсолютного давления от 85 до 106 кПа, пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений ± 1 кПа	Измеритель параметров микроклимата МЕТЕОСКОП-М, рег. № 32014-11
р. 10 Определение метрологических характеристик	Дозаторы механические многоканальные, диапазоны объемов дозирования (от 0,1 до 2,5 мкл, от 1 до 10 мкл, от 5 до 10 мкл, от 10 до 100 мкл, от 100 до 1000 мкл)	Дозаторы механические с варьируемым объемом дозирования ВИОНІТ, рег. № 36152-12

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
	ПЦР-бокс (защитная камера с УФ-лампой) настольный с рециркуляцией воздуха	ПЦР-бокс UVT-S-AR (BS-040107-AAA)
	Термостат для пробирок типа «Эппendorф» от 25 °C до 100 °C	«ТЕРМО 24-15», «Биоком»
	Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппendorф» до 16 тыс об/мин	«Elmi», Латвия, «Hettish»
	Микроцентрифуга - вортекс	Микроцентрифуга - вортекс
	Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости	Вакуумный отсасыватель медицинский
	Термоциклер для 96 луночных планшетов и пробирок объемом 0,2 мл	Термоциклер
	Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл	«SE-2», ООО «НПФ Хеликон», Россия
	Источник питания постоянного тока с напряжением от 150 до 460 В	«Эльф-4», ООО «ДНК-Технология»
	Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей	Система гель-документирования «Взгляд»
	Микроволновая печь 800 Вт	Микроволновая печь
	Мерный цилиндр объемом 1 л по ГОСТ 1770-74	Мерный цилиндр
	Стеклянная колба из термостойкого стекла объемом 250 мл	Стеклянная колба из термостойкого стекла
	Штатив для пробирок объемом 1,5 мл	Штатив для пробирок
	Штатив для пробирок объемом 0,5 мл	
	Штатив для одиночных и стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	Штатив для одиночных и стрипованных пробирок
	Охлаждаемый штатив для пробирок объемом 0,2 мл	Охлаждаемый штатив для пробирок
	Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-Преп» (АмплиСенс K2-9-Et-100, 100 реакций)	Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-Преп» (АмплиСенс K2-9-Et-100, 100 реакций)
	Набор для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с длинных (до 7 kb) и сложных матриц одношаговым методом БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2×) (RM05-40, 40 реакций)	Набор для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с длинных (до 7 kb) и сложных матриц одношаговым методом БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2×) (RM05-40, 40 реакций)

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
	<p>прямой праймер (5' СТАСТCCCCАСССААГААТАГСА 3') Длина 22, молярная масса 6617, количество: 3,5 ОЕ, 145,5 мкл, концентрация: 24,0 ОЕ/мл, 100 пмоль/мкл, 0,66 мкг/мкл, очистка ПААГ</p>	<p>прямой праймер (5' СТАСТCCCCАСССААГААТАГСА 3') ООО «ДНК-Синтез», Россия</p>
	<p>обратный праймер (5' СТГТТАСААТААГАГГССАТГСТ 3') Длина 23, молярная масса 7048, количество: 3,5 ОЕ, 135,2 мкл, концентрация: 25,9 ОЕ/мл, 100 пмоль/мкл, 0,70 мкг/мкл, очистка ПААГ</p>	<p>обратный праймер (5' СТГТТАСААТААГАГГССАТГСТ 3') Длина 23, мол. масса 7048, количество: 3,5 ОЕ, 135,2 мкл, концентрация: 25,9 ОЕ/мл, 100 пмоль/мкл, 0,70 мкг/мкл, очистка ПААГ ООО «ДНК-Синтез», Россия</p>
	<p>Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ»</p>	<p>Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ»</p>
	<p>4×буфер для нанесения ДНК на гель «БиК» Кат. № D-3002</p>	<p>4×буфер для нанесения ДНК на гель «БиК» Кат. № D-3002, ООО «Биолабмикс», Россия</p>
	<p>ДНК маркер Step 100 DNA Ladder</p>	<p>ДНК маркер Step 100 DNA Ladder, ООО «Биолабмикс», Россия</p>
	<p>Комплект реагентов для очистки ПЦР-продуктов ферментным методом, PCR Product Express Cleanup Reagent (YST0242-01, 100 реакций)</p>	<p>PCR Product Express Cleanup Reagent (YST0242-01, 100 реакций)</p>
	<p>Комплект реагентов для постановки реакции секвенирования по Сэнгеру BDT UltraSeq Kit (YST0181-01, 100 реакций)</p>	<p>BDT UltraSeq Kit (YST0181-01, 100 реакций)</p>
	<p>Набор для очистки продуктов реакции секвенирования D-Pure™ Dye Terminator Removal Kit BigDye XTerminator Purification Kit (DP-005, 500 реакций)</p>	<p>Набор для очистки продуктов реакции секвенирования D-Pure™ Dye Terminator Removal Kit BigDye XTerminator Purification Kit (DP-005, 500 реакций)</p>
	<p>Высоко деионизированный формамид Hi-Di Formamide (SenseCareBio-YST0170-01, 25 мл)</p>	<p>высоко деионизированный формамид Hi-Di Formamide (SenseCareBio-YST0170-01, 25 мл)</p>
	<p>Вода деионизованная стерильная, ИСО 3694-77 (ОСТ 11.029.003)</p>	<p>Вода деионизованная, ИСО 3694-77 (ОСТ 11.029.003)</p>
	<p>Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144-2018</p>	<p>Вода дистиллированная</p>

5.1 При проведении поверки рекомендуется применять средства поверки (эталоны), указанные в таблице 2.

5.2 Допускается применение средств поверки с метрологическими и техническими характеристиками, обеспечивающими требуемую точность передачи единиц величин поверяемому средству измерений, указанную в таблице 2.

5.3 Применяемые средства поверки должны быть исправны и поверены, применяемые средства поверки утвержденного типа в качестве эталонов единиц величин должны быть исправны и поверены с присвоением соответствующего разряда по требованию государственных поверочных схем.

5.4. При работе с РНК необходимо использовать одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNasefree», «DNase-free».

6 ТРЕБОВАНИЯ (УСЛОВИЯ) ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

6.1 При проведении поверки необходимо соблюдать требования безопасности, установленные ГОСТ 12.2.003-91 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Оборудование производственное. Общие требования безопасности». Также должны быть соблюдены требования безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на поверяемые анализаторы и применяемые средства поверки.

7 ВНЕШНИЙ ОСМОТР СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

7.1 При внешнем осмотре убедиться в:

- соответствии комплектности анализатора, приведенной в руководстве по эксплуатации анализатора;
- отсутствии механических повреждений, препятствующих нормальной работе;
- наличии маркировки на корпусе анализатора, маркировка должна быть хорошо различима и содержать товарный знак изготовителя, наименование и обозначение анализатора, серийный номер.

Результаты внешнего осмотра считать положительными, если анализатор удовлетворяет вышеперечисленным требованиям.

Анализатор, имеющий дефекты, к поверке не допускается.

8 ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ И ОПРОБОВАНИЕ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

8.1 Перед проведением поверки необходимо выполнить следующие подготовительные работы:

- изучить эксплуатационную документацию на поверяемый анализатор и на применяемые средства поверки;
- выдержать анализатор в условиях окружающей среды, указанных в п. 3.1, не менее 2 ч, если он находился в климатических условиях, отличающихся от указанных в п. 3.1, и подготовить его к работе в соответствии с эксплуатационной документацией;
- подготовить к работе средства поверки в соответствии с указаниями их эксплуатационной документации;
- провести контроль условий поверки на соответствие требованиям, указанным в разделе 3, с помощью оборудования, указанного в таблице 2.

8.2 Анализатор, имеющий дефекты, к поверке не допускается.

8.3 Опробование анализатора проводить в следующей последовательности:

- включить монитор и компьютер;
- включить электропитание анализатора;
- запустить программное обеспечение Gene Test на компьютере;
- дождаться завершения установления связи анализатора с компьютером и убедиться в отсутствии функциональных ошибок.

Анализатор допускается к дальнейшей поверке, если при опробовании успешно выполнены условия п. 8.3 и не выявлено функциональных ошибок.

9 ПРОВЕРКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

Проверку идентификационных данных ПО проводить путем сличения идентификационных данных ПО, указанных в описании типа на анализаторы, с идентификационными данными ПО, считанными с помощью автономного ПО Gene Sequencing Analysis. Номер версии (идентификационные данные ПО) отображается в меню «About» вкладки «Help(H)».

Анализатор допускается к дальнейшей поверке, если программное обеспечение соответствует требованиям, указанным в описании типа.

10 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

10.1 Определение относительной погрешности измерений массовых долей нуклеотидов.

Определение относительной погрешности измерений массовых долей нуклеотидов в фрагменте ДНК проводят, путем сравнения измеренного анализатором фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, с аттестованными значениями, указанными в паспорте ГСО стандартного образца инактивированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2 в следующей последовательности:

- электрофоретическое разделение продуктов секвенирования ДНК методом капиллярного электрофореза;

- установление нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, с паспортом образца;

- сравнение полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, с паспортом образца.

10.1.1. Электрофоретическое разделение продуктов секвенирования ДНК методом капиллярного электрофореза

Подготовить контрольный раствор продукта реакции секвенирования ГСО в соответствии с Приложением Б.

Включить анализатор и автономное ПО Gene Test в соответствии с руководством по эксплуатации.

Проверить объем буфера и воды в резервуарах, включая анодный буфер (объем должен доходить до метки).

Проверить отсутствие пузырей в блоке заполнения полимером и всех каналах, заполненных полимером. При необходимости удалить пузыри.

Проверить состояние капилляров на предмет повреждения или загиба.

Проверить уровень полимера в емкости с полимером.

Поместить 96-луночный планшет с контрольными образцами на чистую горизонтальную поверхность. Затем положить планшет для проб на основу. Зафиксировать планшет для проб и основу с помощью крепежной скобы.

Убедиться, что передняя дверца анализатора и дверца термостата закрыты, нажать кнопку «TRAY» («Выдвинуть автосэмплер») на приборной панели анализатора и дождаться, пока зеленый индикатор анализатора вместо мигающего станет постоянным и лоток перестанет двигаться.

Открыть переднюю дверцу анализатора, поместить лоток для проб в позицию А и убедиться, что лоток для проб расположен горизонтально на автосэмплере.

Закрыть переднюю дверцу прибора и подождать, пока зеленый индикатор прибора вместо мигающего станет постоянным.

Настроить метод для анализа, для этого:

- перейти в меню программного обеспечения «Управление методом» - «Управление планшетом» - «Новый планшет»;

- в окне «Первый шаг в создании нового запуска» заполнить содержимое всех элементов, в строке «Тип запуска» выбрать «Sequence», в строке «Тип планшета» выбрать «96Well», нажать кнопку «Далее» (рисунок 1);

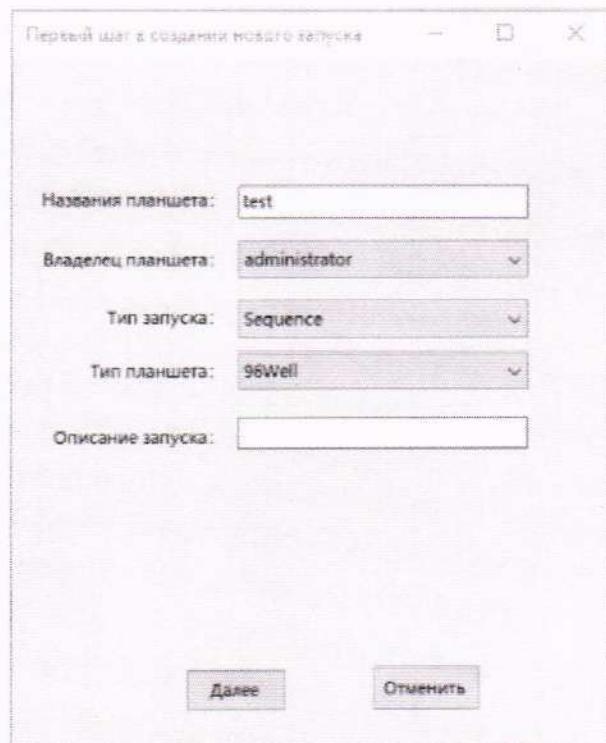


Рисунок 1

- в окне «Второй шаг в создании нового запуска» заполнить данные о контрольном растворе. Каждая строка соответствует информации пробы о положении ячейки соответственно. Ввести название образца, выбрать значения для каждого образца: метка «BD», модуль запуска «Sequence50_POP7_Standard», набор «50-POP7-8.5-V3». Нажать кнопку «Подтвердить» (рисунок 2).

Позиция	Название пробки	Тип метода	Номер	Оператор	Модуль запуска	Партия	Подготовка	Изменение
A01	контроль 1	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
B01	контроль 2	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
C01	контроль 3	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
D01	контроль 4	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
E01	контроль 5	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
F01	контроль 6	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
G01	контроль 7	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
H01	контроль 8	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
A02	образец 9	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
B02	образец 10	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
C02	образец 11	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
D02	образец 12	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
E02	образец 13	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
F02	образец 14	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
G02	образец 15	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
H02	образец 16	BD			Sequence50_POP7_Standard	50-POP7-8.5-V3		
A03								
B03								
C03								
D03								
E03								
F03								
G03								
H03								

Рисунок 2

Выбрать форму в списке подготовленных форм и нажать кнопку «Привязать планшет к позиции А».

Рекомендуемые значения параметров модуля запуска «Sequence50_POP7_Standard» приведены в таблице 3. Для настройки модуля запуска «Sequence50_POP7_Standard» перейти в меню «Модуль запуска» во вкладке «Управление методом», выбрать «Sequence50_POP7_Standard» и нажать на кнопку «Изменить».

Таблица 3 – Параметры электрофореза

Наименование параметра	Значение
CapFillVol	12000
Current_Tolerance	5
DataDelayTime	15
InjectionVoltage	1.8
LaserPower	15
OvenTemperature	60
PreRunTime	180
PreRunVoltage	15
RunTime	6500
RunVoltage	8.5
VoltageNumberOfSteps	40
VoltageStepInterval	15

Запустить программу секвенирования, для этого выбрать подключенную форму, нажать кнопку «Запуск» на командной панели инструментов.

После завершения работы формы пробы автоматически отключается от лотка. Необработанные данные проб формате «.ab1», содержащие сырье данные секвенирования, будут в сохранены в папке, указанной системой D:\Data.

10.1.2. Установление нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, с паспортом образца

Установление полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, осуществляется при анализе данных полученных в п. 10.1.1. в программе Gene Sequencing Analysis.

Анализ данных выполняется в программе Gene Sequencing Analysis в следующей последовательности:

- запустить программу Gene Sequencing Analysis;
- в основном меню программы Gene Sequencing Analysis нажать кнопку «Add»  и открыть файлы формата «.ab1», полученные согласно инструкции, приведенной выше, установить флажки в столбце «Method» и запустить анализ, нажать кнопку «Run» ;
- после завершения анализа данных, визуально оценить полученные последовательности ДНК и в основном меню программы Gene Sequencing Analysis нажать кнопку «Setting» . В открывшемся меню установить параметры в соответствии с таблицей 4;

Таблица 4 – Параметры обработки данных

Наименование параметра	Значение
меню «Mixed Base»	
Use Second Mixed Base Identification	«активно»
меню «Mixed Base»	
Use Second Mixed Base Identification	«активно»
First Base	20*
End Base	845**
меню «Save Setting»	
Write .Seq File	«активно» «ab1»

Примечания:

* - рекомендуемое значение, значение выбирается из диапазона от 15 до 40 пар оснований, исключающее из анализа низкокачественные последовательности в пределах первых пар оснований связывания праймеров;

** - рекомендуемое значение, значение выбирается из расчетного значения длины фрагмента ДНК ограниченного праймерами и низкого разрешения различия в одной паре оснований на окончании отрезка ДНК.

- в основном меню программы Gene Sequencing Analysis нажать кнопку «Run» 
- после завершения анализа данных, сохранить проанализированные образцы в формате «.seq», для этого в основном меню программы Gene Sequencing Analysis нажать кнопку «Save» .

10.1.3. Сравнение полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, с паспортом образца

Сравнение полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, осуществляется методом сравнения полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома, с последовательностью, приведенной в паспорте ГСО.

Проанализированные образцы в формате «.seq» открыть в текстовом редакторе. Нуклеотидная последовательность фрагмента генома в файлах формата «.seq» записана в виде текстовой последовательности.

Выровнять начало нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, для каждого образца. Первые пары нуклеотидной последовательности образцов должны совпадать с первыми парами нуклеотидной последовательности участка, приведенной в паспорте ГСО, ограниченного праймерами.

Сравнить текстовые последовательности образцов с текстовой последовательностью участка, приведенной в паспорте ГСО, ограниченного праймерами.

Определить массовую долю аденина (A), гуанина (G), цитозина (C), тимина (T) в последовательности участка, приведенной в паспорте ГСО, ограниченного праймерами.

11 ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ МЕТРОЛОГИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ

11.1 Рассчитать относительную погрешность измерений массовых долей нуклеотидов, по формуле:

$$\delta_{Ai} = \frac{N_{Ai, \text{изм.}} - N_A}{N_A} \cdot 100, \quad (1)$$

где N_A – массовая доля аденина (A) (гуанина (G), цитозина (C), тимина (T)) в последовательности участка, приведенной в паспорте ГСО, ограниченного праймерами, %;

$N_{Ai, \text{изм.}}$ – массовая доля аденина (A) (гуанина (G), цитозина (C), тимина (T)) в прочтении последовательности, %.

11.2 Рассчитать относительное значение среднеквадратического отклонения измерений массовых долей нуклеотидов δ , %, вычисляется по формуле:

$$\delta = \frac{S}{\bar{N}} \cdot 100, \quad (2)$$

где \bar{N} – среднее арифметическое значение массовых долей аденина (A) ((гуанина (G), цитозина (C), тимина (T)) в прочтенных последовательностях, вычисляемое по формуле (3));

S - среднеквадратическое отклонение измерений массовых долей нуклеотидов, вычисляемое по формуле (4).

$$\bar{N} = \frac{\sum N_{Ai, \text{изм.}}}{n}, \quad (3)$$

где n - количество контрольных образцов.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (N_{Ai,изм.} - \bar{N}_A)^2}{n-1}}, \quad (4)$$

11.3 Анализатор подтверждает соответствие метрологическим требованиям, установленным при утверждении типа, если полученные значения относительной погрешности измерений массовых долей нуклеотидов и относительного среднеквадратического отклонения результатов измерений массовых долей нуклеотидов не превышают пределов, указанных в Приложении А.

11.4. При невыполнении любого из вышеперечисленных условий (когда анализатор не подтверждает соответствие метрологическим требованиям), поверку анализатора прекращают, результаты поверки признают отрицательными.

12 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

12.1 Результаты поверки анализатора подтверждаются сведениями, включенными в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений, в соответствии с порядком, установленным действующим законодательством в области обеспечения единства измерений.

12.2 По заявлению владельца анализатора или лица, представившего его на поверку, положительные результаты поверки (когда анализатор подтверждает соответствие метрологическим требованиям) оформляют свидетельством о поверке по форме, установленной в соответствии с действующим законодательством в области обеспечения единства измерений.

12.3 По заявлению владельца анализатора или лица, представившего его на поверку, отрицательные результаты поверки (когда анализатор не подтверждает соответствие метрологическим требованиям) оформляют извещением о непригодности к применению средства измерений по форме, установленной в соответствии с действующим законодательством в области обеспечения единства измерений.

12.4 Протоколы поверки анализатора оформляются по произвольной форме.

Ведущий инженер-метролог



И.И. Буров

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

ОСНОВНЫЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗАТОРОВ

Таблица А.1 – Метрологические характеристики

Наименование характеристики	Значение
Диапазон измерений массовых долей нуклеотидов, %	от 1 до 100
Пределы допускаемой относительной погрешности измерений массовых долей нуклеотидов, %	$\pm 2,5$
Предел допускаемого относительного среднеквадратического отклонения результатов измерений массовых долей нуклеотидов, %	1,0

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
 (обязательное)
МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

1. Контрольные растворы для постановки реакции секвенирования по Сэнгеру к капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе приготавливают в последовательности:

1.1. Из ГСО 11661-2020 выделяют тотальную РНК SARS-CoV-2.

1.2. С помощью реакции обратной транскрипции превращают выделенную РНК в комплементарную ДНК, ограниченную праймерами.

1.3. Проводят качественную оценку полученных ПЦР-продуктов в агарозном геле.

1.4. Проводят очистку ПЦР-продуктов с использованием ферментативной очистки.

1.5. Проводят постановку реакции секвенирования по Сэнгеру.

1.6. Проводят очистку продуктов реакции секвенирования по Сэнгеру.

1.7. Подготавливают продукты реакции секвенирования по Сэнгеру к капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе.

2. Приготовление контрольных растворов

2.1. Выделение РНК SARS-CoV-2 из ГСО 11661-2020

Выделение РНК SARS-CoV-2 из ГСО 11661-2020 проводится с использованием набора для экстракции «РИБО-Преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

2.1.1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от +2 °C до +8 °C) прогреть при температуре +65 °C до полного растворения кристаллов.

2.1.2. Подготовить и промаркировать две одноразовые пробирки на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (РНК и ОК1), в каждую пробирку добавить по 300 мкл раствора для лизиса.

2.1.3. В пробирку РНК с раствором для лизиса внести 100 мкл ГСО 11661-2020. В пробирку отрицательного контроля (ОК1) внести 100 мкл ОКО (деионизированная вода).

2.1.4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °C в термостате.

2.1.5. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе.

2.1.6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс. об/мин.

2.1.7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя аспиратор и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.

2.1.8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмычки № 3 (входит в состав набора для экстракции «РИБО-Преп»), плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

2.1.9. Процентрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.

2.1.10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя аспиратор и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

2.1.11. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмычки № 4 (входит в состав набора для экстракции «РИБО-Преп»), плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

2.1.12. Процентрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.

2.1.13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя аспиратор и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

2.1.14. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

2.1.15. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

2.1.16. Процентрифугировать пробирки при 13 тыс. об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Жидкость в пробирке «РНК» содержит РНК.

2.1.17. Полученную жидкость, содержащую РНК аликвотировать по 10 мкл.

РНК может храниться до 24 часов при температуре от +2°C до +8 °C и не более года при температуре не выше минус 16 °C.

2.2. Превращение выделенной РНК в комплементарную ДНК ограниченную праймерами, с помощью реакции обратной транскрипции

Превращение выделенной РНК в комплементарную ДНК, ограниченную праймерами, с помощью реакции обратной транскрипции проводится с использованием набора для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с длинных (до 7 kb) и сложных матриц одношаговым методом БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2×), прямого праймера GSO_N3_F и обратного праймера GSO_N3_R, выделенной РНК по п.2.1.

2.2.1. Разморозить 2× буфер для ОТ-ПЦР-Премиум и тщательно перемешать.

Подготовить и промаркировать 8 тонкостенных пробирок объемом 0,2 мл для ПЦР («ДНК1» - 5 пробирок, «ОК2» - 1 пробирка, «F» - 1 пробирка, «R» - 1 пробирка).

В пробирки «F» и «R» внести по 9 мкл дедионизированной воды и добавить по 1 мкл стокового раствора прямого праймера GSO_N3_F в пробирку «F» и стокового раствора обратного праймера GSO_N3_R в пробирку «R».

Поместить тонкостенные пробирки «ДНК1» и «ОК2» в охлажденный штатив и добавить компоненты в соответствии с таблицей Б.1 из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Таблица Б.1

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	2× смесь для ОТ-ПЦР- Премиум	25
2	БиоМастер Премиум-микс	2
3	Прямой праймер GSO_N3_F (10 пмоль/мкл)	1
4	Обратный праймер GSO_N3_R (10 пмоль/мкл)	1
5	Выделенная РНК/отрицательный контроль	10
6	Дедионизированная стерильная вода, обработанная ДЭПК	11

Осторожно перемешать на микроцентрифуге и сбросить капли, используя центрифугу.

2.2.2. Поместить пробирки «ДНК1» и «ОК2» с приготовленными растворами в термоциклир и задать программу термоциклирования в соответствии с таблицей Б.2.

Таблица Б.2 – Программа термоциклирования

Этап	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	45	30 мин	1
Предварительная денатурация	93	5 мин	1
Денатурация	93	10 сек	
Отжиг	61	20 сек	35
Элонгация	68	1 мин 10 сек	
Финальная элонгация	68	10 мин	1
Хранение	4	-	-

Примечание - В случае использования термоциклира без греющейся крышки, добавить в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.

2.2.3. Проанализировать продукт амплификации из одной пробирки «ДНК1» и «ОК2» электрофорезом в соответствии с п. 2.3.

2.2.4. Полученный ПЦР продукт аликвотировать по 8 мкл.

ПЦР продукт с комплементарной ДНК может храниться при температуре +4 °C – 1 месяц, при температуре не выше минус 20 °C – 1 год.

2.3. Качественная оценка полученных ПЦР-продуктов в агарозном геле

Качественная оценка ПЦР-продуктов полученных по п. 2.2 проводится для оценки длины фрагмента комплементарной ДНК, с применением комплекта реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ», 4×буфер для нанесения ДНК на гель «БиК» и ДНК маркер Step 100 DNA Ladder.

2.3.1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер, для этого в мерный цилиндр 1000 мл добавить 25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом и довести объем дистиллированной водой до 500 мл, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

2.3.2. Агарозу из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить 100 мл рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.

2.3.3. Выровнять горизонтально столик для заливки гелей, вставить подложку для заливки геля, закрепить ее, установить гребенку.

2.3.4. Залить расплавленный агарозный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза.

2.3.5. После полного застывания геля (не менее 30 мин при комнатной температуре) перенести подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза и осторожно вынуть из него гребенку, не повредив лунки.

2.3.6. Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

2.3.7. Подготовить и промаркировать 2 тонкостенные пробирки объемом 0,2 мл для ПЦР («ДНК2» - 1 пробирка, «ОК3» - 1 пробирка).

В пробирки внести по 2 мкл **4×буфера для нанесения ДНК**, в пробирку «ДНК2» внести 6 мкл ПЦР продукта, полученного по п. 2.2.2, из пробирки «ДНК1», в пробирку «ОК3» внести 6 мкл отрицательного контроля полученного по п. 2.2.2. из пробирки «ОК2».

2.3.8. Внести в лунки подготовленного геля по 8 мкл растворов:

в лунку № 1 – раствор из пробирки «ДНК2»;

в лунку № 2 – ДНК-маркер;

в лунку № 3 – раствор из пробирки «ОК3»

2.3.9. Включить источник питания и проводить электрофорез при 10 В/см (при длине геля 10 см на источнике питания выставляется параметр 113 В).

2.3.10. По завершении электрофореза выключить источник тока и перенести гель на трансиллюминатор. В анализируемом образце должен быть фрагмент на уровне 900 пар оснований. В отрицательном контроле фрагментов (бэндов) не должно быть. В случае выявления фрагментов в отрицательном контроле результаты по всем образцам признают недействительными, так как произошла контаминация. Приготовление контрольных растворов необходимо повторить с п.2.1.

2.4. Очистка ПЦР-продуктов с использованием ферментативной очистки

Очистка ПЦР-продуктов проводится с использованием PCR Product Express Cleanup Reagent.

2.4.1. В пробирке объемом 0,2 мл для ПЦР смешивают 7,5 мкл ПЦР-продукта с 3 мкл реагента PCR Product Express Cleanup Reagent.

Полученный раствор инкубируют в термоцикlerе по программе приведенной в таблице Б.3.

Таблица Б.3 – Программа термостатирования

Этап	Температура, °C	Время
Инкубация	37	15 мин
Инкубация	80	15 мин
Хранение	4	∞

2.4.2. Оценить концентрацию ПЦР-продукта при помощи спектрофотометрических или флуориметрических методов.

2.4.3. Очищенный ПЦР-продукт готов к постановке реакции секвенирования по Сэнгеру.

2.5. Постановка реакции секвенирования по Сэнгеру

Постановка реакции секвенирования по Сэнгеру проводится с использованием реагентов BDT UltraSeq Kit.

2.5.1. Перед приготовлением реакционной смеси размораживают реагенты, входящие в состав набора BDT UltraSeq Kit.

Подготовить и промаркировать 9 тонкостенных пробирок объемом 0,2 мл для ПЦР («КО» - 8 пробирок, «F» - 1 пробирка).

Подготовить раствор прямого праймера концентрацией 3,2 пмоль/мкл, для этого в пробирку «F» внести 30 мкл деионизированной воды и добавить 1 мкл стокового раствора прямого праймера GSO_N3_F.

2.5.2. Для приготовления 8 контрольных образцов, в каждой пробирке «КО» смешивают компоненты в соответствии с таблицей Б.4.

Таблица Б.4

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	5x Sequencing Reaction Buffer	1,8
2	Прямой праймер (3,2 пмоль/мкл)	1
3	BDT UltraSeq Master Mix	0,5
4	ПЦР-продукт (5-20 нг)	1
5	Деионизированная стерильная вода	5,7

Полученный раствор амплифицируют в термоциклиере по программе, приведенной в таблице Б.5.

Таблица Б.5 – Программа термоциклирования

Этап	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Инкубация	96	1 мин	1
Денатурация	96	10 сек	
Отжиг праймера	50	5 сек	30
Элонгация	60	4 мин	
Хранение	4	-	-

2.5.3. После завершения реакции секвенирования переходят к стадии очистки продуктов секвенирования по Сэнгеру.

2.6 Очистка продуктов реакции секвенирования по Сэнгеру

Данная процедура проводится с использованием реагентов D-Pure™ Dye Terminator Removal Kit.

Подготовить и промаркировать 8 тонкостенных пробирок объемом 0,2 мл для ПЦР «КО1».

2.6.1. Перемешать пипетированием магнитные частицы D-Pure.

2.6.2. Внести в каждую пробирку «КО» по 10 мкл магнитных частиц D-Pure.

2.6.3. Внести в каждую пробирку «КО» по 42 мкл 75% этанола, хорошо перемешайте пипетированием.

2.6.4. Поместить пробирки «КО» с полученной смесью на магнитный штатив на 3 минуты. Магнитные частицы в растворе должны притянуться к магниту, а раствор стать светлым.

2.6.5. Не снимая пробирки с магнитного штатива, удалить весь супернатант.

Внимание! Не захватывайте в процессе удаления магнитные частицы.

2.6.6. Внесите в пробирки «КО» с магнитными частицами по 100 мкл 75% этанола и подождите 30 секунд.

2.6.7. Не снимая пробирки с магнитного штатива, удалите весь супернатант.

Внимание! Не захватывайте в процессе удаления магнитные частицы.

2.6.8. Повторить пункты 2.6.6 и 2.6.7 дважды. При последнем удалении супернатанта убедитесь, что в пробирке не остался этанол.

2.6.9. Снять пробирки с магнитного штатива и просушить магнитные частицы при комнатной температуре в течение 3-10 минут. Важно! Не пересушивайте магнитные частицы.

2.6.10. Добавить в пробирки «КО» с просушенными магнитными частицами по 40 мкл элюирующего буфера или деионизованной воды, хорошо перемешать пипетированием и инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут.

2.6.11. Поместите пробирки «КО» с полученной смесью на магнитный штатив на 3 минуты. Магнитные частицы в растворе должны притянуться к магниту, а раствор стать светлым.

2.6.12. Не снимая пробирки с магнитного штатива и не захватывая магнитные частицы, отобрать по 30 мкл супернатанта и перенести в пробирки «КО1».

Важно! Не захватывайте магнитные частицы.

Супернатант содержит очищенные продукты реакции по Сенгеру и готов для электрофоретического разделения на генетическом анализаторе.

2.7 Подготовка продуктов реакции секвенирования по Сэнгеру к капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе

Данная процедура проводится с использованием высоко деионизированного формамида Hi-Di Formamide.

2.7.1. Поместить 15 мкл очищенных продуктов реакции по Сенгеру, приготовленных по п. 2.6. в 96-луночный планшет в 1 и 2 ряд планшета (16 повторов) и добавить 10 мкл формамида, перемешать пипетированием. Закрыть ячейки антииспарителем (септой).

2.7.2 Планшет с образцами поместить в термоциклер и денатурировать по программе, приведенной в таблице Б.6.

Таблица Б.6 – Программа термостатирования

Этап	Температура, °C	Время
Денатурация	96	3 мин
Охлаждение	4	2 мин
Хранение	4	∞

После проведенной процедуры контрольные образцы готовы к проведению капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе.