



**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

М.п.

«27» февраля 2025 г.



Государственная система обеспечения единства измерений

Анализатор генетический капиллярного электрофореза HONOR 1616

Методика поверки

ИМТ-МП-0067-2025

г. Москва
2025 г.

1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1 Настоящая методика поверки распространяется на анализатор генетический капиллярного электрофореза HONOR 1616 (далее по тексту – анализатор), серийный номер 200312300012, изготовленный Обществом с ограниченной ответственностью «НПФ Хеликон» (ООО «НПФ Хеликон»), и устанавливает порядок и объем его первичной и периодической поверки.

1.2 Используемые средства поверки обеспечивают прослеживаемость анализатора к гэт208-2024 согласно государственной поверочной схеме, утвержденной Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28.12.2024 № 3158 «Об утверждении Государственной поверочной схемы для средств измерений содержания органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах».

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

1.4 Поверка 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 поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки	Наименование операции	Обязательность выполнения операций поверки при	
		первичной поверке	периодической поверке
7	Внешний осмотр средства измерений	Да	Да
8	Подготовка к поверке 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 анализатора допускаются специалисты, изучившие эксплуатационные документы на поверяемый анализатор, 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 23.01.2023 года) «Об утверждении критериев аккредитации и перечня документов, подтверждающих соответствие заявителя, аккредитованного лица критериям аккредитации».

4.4. Для получения данных допускается участие операторов, обслуживающих анализатор (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 средства поверки
Основные средства поверки		
р. 10 Определение метрологических характеристик	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 CO (P=0,95), $\pm 0,5$ %	Стандартный образец инаktivированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2, рег. № 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 ПЦР-бокс (защитная камера с УФ-лампой) настольный с рециркуляцией воздуха Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 °C до 100 °C Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин Микроцентрифуга - вортекс Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления	Дозаторы механические с варьируемым объемом дозирования ВЮНИТ, рег. № 36152-12

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средства поверки
	надосадочной жидкости	
	Термоциклер для 96 луночных планшетов и пробирок 0,2 мл	
	Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл	
	Источник питания постоянного тока с напряжением от 150 до 460 В	
	Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей	
	Система гель-документирования «Взгляд»	
	Микроволновая печь 800 Вт	
	Мерный цилиндр на 1 л по ГОСТ 1770-74	
	Стеклоаналог колба из термостойкого стекла на 250 мл	
	Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-Преп» (АмплиСенс К2-9-Ет-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)	
	прямой праймер (5' СТАСТСССACCCCAAGAATAGCA 3') Длина 22, мол. масса 6617, количество: 3,5 ОЕ, 145,5 мкл, концентрация: 24,0 ОЕ/мл, 100 пмоль/мкл, 0,66 мкг/мкл, очистка ПААГ ООО «ДНК-Синтез», Россия	
	обратный праймер (5' СТГТТАСААТАAGAGGCCATGCT 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	
	Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ»	
	4×буфер для нанесения ДНК на гель «БиК» Кат. № D-3002, ООО «Биолабмикс», Россия	
	ДНК маркер Step 100 DNA Ladder, ООО «Биолабмикс», Россия	
	Комплект реагентов для очистки ПЦР-продуктов ферментным методом, PCR Product Express Cleanup Reagent (YST0242-01, 100 реакций)	
	Комплект реагентов для постановки реакции секвенирования по Сэнгеру BDT UltraSeq Kit (YST0181-01, 100 реакций)	
	Набор для очистки продуктов реакции секвенирования D-Pure™ Dye Terminator Removal Kit BigDye XTerminator Purification Kit (DP-005, 500 реакций)	
	Высоко деионизированный формамид Hi-Di Formamide (SenseCareBio-YST0170-01, 25 мл)	
	Вода деионизованная стерильная, ИСО 3694-77 (ОСТ 11.029.003)	
	Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144-2018	

5.1 При проведении поверки рекомендуется применять средства поверки (эталон), 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 поверяемый анализатор 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 анализатор, 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 проверке, 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.

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);

Первый шаг в создании нового запуска

Название планшета: test

Владелец планшета: administrator

Тип запуска: Sequence

Тип планшета: 96Well

Описание запуска:

Далее Отменить

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 в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Параметры модуля запуска

Наименование	Значение	
	Капиллярная сборка 36 см	Капиллярная сборка 50 см
Метка	BD	BD
Модуль запуска	Sequence36 POP7 Standard	Sequence50 POP7 Standard
Набор	36-POP7-8.5-V3	50-POP7-8.5-V3

- нажать кнопку «Подтвердить» (рисунок 2).

Второй шаг в создании нового запуска

Проб.	Название образца	Объем	Модуль запуска	Платформа	Оператор	Тип запуска	Тип планшета	Описание запуска	Дата запуска	Время запуска	Статус
801	sample 1	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
802	sample 2	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
803	sample 3	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
804	sample 4	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
805	sample 5	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
806	sample 6	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
807	sample 7	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
808	sample 8	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
809	sample 9	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
810	sample 10	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
811	sample 11	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
812	sample 12	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
813	sample 13	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
814	sample 14	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
815	sample 15	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
816	sample 16	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
817	sample 17	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
818	sample 18	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
819	sample 19	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							
820	sample 20	80	Sequence36 POP7 Standard	36-POP7-8.5-V3							

Подтвердить Отменить OK

Рисунок 2

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

Рекомендуемые значения параметров модуля запуска приведены в таблице 4. Для настройки модуля запуска перейти в меню «Модуль запуска» во вкладке «Управление методом», выбрать модуль запуска и нажать на кнопку «Изменить».

Таблица 4 – Параметры электрофореза

Наименование	Значение	
	Модуль запуска «Sequence36 POP7 Standard»	Модуль запуска «Sequence50 POP7 Standard»
OvenTemperature	55	60
CapFillVol	14600	14600
Current Stability	5	5
PreRunVoltage	15	15
PreRunTime	180	180
InjectionVoltage	1.6	1.6
InjectionTime	18	18
DataDelayTime	1	1
RunVoltage	8.5	8.5
RunTime	6500	6500
LaserPower	15	15
VoltageNumberOfSteps	20	40
VoltageStepInterval	15	15

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

После завершения работы форма пробы автоматически отключается от лотка. Необработанные данные проб в формате «.abl», содержащие сырые данные секвенирования, будут 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» , открыть файлы формата «.abl», 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 устанавливаются параметры, в соответствии с таблицей 5;

Таблица 5 – параметры обработки данных


Наименование	Значение
меню «Mixed Base»	
Use Second Mixed Base Identification	«активно»
меню «Mixed Base»	
Use Second Mixed Base Identification	«активно»


Наименование	Значение
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, исключая из анализа низкокачественные последовательности в пределах первых пар оснований связывания праймеров;

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

- 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» и файл последовательности нуклеотидов генома одноцепочечной РНК штамма «ГК2020/1» вируса SARS-CoV-2 «EPI_ISL_421275.fasta» из базы данных GISAID (EPI_ISL_421275) или в текстовом формате «.txt» непрерывной последовательности, скопированной из описания типа на ГСО 11661-2020 (без пробелов и специальных знаков), открыть в «Molecular Evolutionary Genetics Analysis» для выравнивания последовательностей. Нуклеотидная последовательность фрагмента генома в файлах формата «.seq» записана в виде непрерывной текстовой последовательности.

Выравненные последовательности скопировать и вставить в текстовый файл для анализа.

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

Определить массовую долю аденина (А), гуанина (G), цитозина (С), тимина (Т) 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 (А) (гуанина (G), цитозина (С), тимина (Т)) в последовательности участка, приведенной в паспорте ГСО, ограниченного праймерами, %;

$N_{Ai, \text{изм.}}$ – массовая доля аденина (А) (гуанина (G), цитозина (С), тимина (Т)) в прочтенной последовательности, %.

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

$$\delta = \frac{S}{\overline{N_A}} \cdot 100, \quad (2)$$

где $\overline{N_A}$ – среднее арифметическое значение массовых долей аденина (А) ((гуанина (G), цитозина (C), тимина (T)) в прочтенных последовательностях, вычисляемое по формуле (3):

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

$$\overline{N_A} = \frac{\sum N_{A, \text{изм.}}}{n}, \quad (3)$$

где n – количество контрольных образцов.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (N_{A, \text{изм.}} - \overline{N_A})^2}{n - 1}} \quad (4)$$

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 измерения 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 АНАЛИЗАТОРА**

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 измерения массовых долей нуклеотидов, %	1,0

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

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

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

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

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

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

Б.1.5. Проводят постановку реакции секвенирования по Сэнгеру.

Б.1.6. Проводят очистку продуктов реакции секвенирования по Сэнгеру.

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

Б.2. Приготовление контрольных растворов

Б.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).

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

Б.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.

Б.2.1.3. В пробирку РНК с раствором для лизиса внести 100 мкл ГСО 11661-2020. В пробирку отрицательного контроля (ОК1) внести 100 мкл ОК0 (деионизированная вода).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Б.2.2. Синтез комплементарной ДНК на матрице РНК SARS-CoV-2 и ее копирование

Реакция обратной транскрипции участка РНК SARS-CoV-2 с получением комплементарной ДНК (далее – кДНК) длиной 907 п.о. и дальнейшим ее копированием 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. Б.2.1.

Б.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 деионизированной 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	Деионизированная стерильная вода, обработанная ДЭПК	11

Осторожно перемешайте на микроцентрифуге и сбросьте капли, используя центрифугу.

Б.2.2.2. Поместите пробирки «ДНК1» и «ОК2» с приготовленными растворами в термоциклер и задайте программу термоциклирования в соответствии с таблицей Б.2.

Таблица Б.2 – Программа термоциклирования

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

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

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

Б.2.2.4. Полученный ПЦР продукт аликвотировать по 8 мкл.

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

Б.2.3. Качественная оценка полученных ПЦР-продуктов в агарозном геле

Качественная оценка ПЦР-продуктов полученных по п. Б.2.2. проводится для оценки длины фрагмента кДНК, 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.

Б.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.

Б.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.

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

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

Б.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.

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

Б.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. Б.2.2.2, из пробирки «ДНК1», в пробирку «ОК3» внести 6 мкл отрицательного контроля полученного по п. Б.2.2.2, из пробирки «ОК2».

Б.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 пробирку «ОК3»

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

Б.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. Б.2.1.

Б.2.4. Очистка ПЦР-продуктов с использованием ферментативной очистки

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

Б.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 термоциклере 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	∞

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

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

Б.2.5. Постановка реакции секвенирования по Сэнгеру

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

Б.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.

Б.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 термоциклере 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	30
Отжиг праймера	50	5 сек	
Элонгация	60	4 мин	
Хранение	4		

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

Б.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».

Б.2.6.1. Перемешайте пипетированием магнитные частицы D-Pure.

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

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

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

Б.2.6.5. Не снимая пробирки с магнитного штатива, удалите весь супернатант.

Внимание! Не захватывайте в процессе удаления магнитные частицы.

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

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

Внимание! Не захватывайте в процессе удаления магнитные частицы.

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

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

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

Б.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.

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

Важно! Не захватывайте магнитные частицы.

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

Б.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.

Б.2.7.1. Помещают 15 мкл очищенных продуктов реакции по Сенгеру, приготовленных по п. Б.2.6. в 96-луночный планшет в 1 и 2 ряд планшета (16 повторов) и добавляют 10 мкл формамида, перемешивают пипетированием. Закройте ячейки антииспарителем (септой).

Б.2.7.2 Планшет с образцами помещают в термоциклер и денатурируют 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.