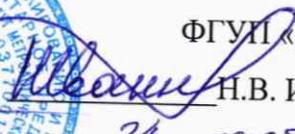


УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора

по производственной метрологии

ФГУП «ВНИИМС»

 Н.В. Иванникова

« 24 » *декабрь* 2020 г.



Государственная система обеспечения единства измерений

Анализаторы генетические капиллярного электрофореза

Нанофор 05

Методика поверки

009-24-19 МП

г. Москва,
2020 г.

Данная методика поверки распространяется на Анализаторы генетические капиллярного электрофореза Нанофор 05 (далее по тексту – анализаторы) и устанавливает методы и средства их первичной и периодической поверки.

Интервал между поверками – 1 год.

1 Операции и средства для проведения поверки

При проведении поверки должны быть выполнены операции и применены средства, указанные в таблице 1.

Таблица 1.

Наименование операции	Номера пунктов методики	Средства поверки и их основные характеристики
Внешний осмотр	5.1	-
Опробование	5.2	-
Определение идентификационных данных программного обеспечения	5.3	-
Определение метрологических характеристик	5.4	ГСО 11607-2020 фрагмента митохондриальной ДНК человека 1 культуры клеток линии HL-60 (участок 5999–7792), средства поверки в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 Требования к вспомогательным устройствам, материалам и реактивам

№ п/п	Оборудование и реактивы	Требования
1.	очищенный продукт реакции секвенирования, полученный в соответствии с инструкцией ГСО	-
2.	амплификатор (термоциклер) с нагреваемой крышкой, позволяющей проводить ПЦР без использования минерального масла для микропробирок вместимостью 0,2 см ³	-
3.	вода для молекулярной биологии, свободная от нуклеаз, деионизованная	ГОСТ Р 52501-2005
4.	миницентрифуга с роторами для микропробирок вместимостью 0,2 см ³ ; 0,6 см ³ и 1,5 см ³ со скоростью вращения не менее 2400 об/мин	-
5.	дозаторы жидкостей лабораторные с варьируемым объемом доз	ГОСТ 28311-89
6.	центрифуга с ротором для 96-луночных планшетов	-
7.	холодильник бытовой электрический, с холодильной камерой, обеспечивающей поддержание температуры от 2°С до 8°С, с морозильной камерой, обеспечивающей температуру не выше минус 18°С	ГОСТ 26678-85
8.	контейнеры для сброса наконечников и использованных пробирок	-
9.	наконечники с фильтром для дозаторов с варьируемыми объемами доз: 10 мм ³ , 20 мм ³ , 100 мм ³ , 200 мм ³ , 1000 мм ³	-

10.	перчатки одноразовые лабораторные не опудренные	
11.	пробирки полипропиленовые типа Фалькон с завинчивающейся крышкой вместимостью 50 см ³	-
12.	Пробирки тонкостенные в 96-луночных планшетах объемом 0,2 см ³ с полу-юбкой <i>Semi-Skirted PCR Plates - 3425-00</i> или планшеты без юбки <i>Non-Skirted PCR Plates - 3400-00</i> производства SSI, США	-
13.	полимер для капиллярного электрофореза «ПДМА-6» (СИНТОЛ, Россия)	-
14.	электродный буфер для капиллярного электрофореза «ТАПС буфер 10X» (СИНТОЛ, Россия) (10-кратный концентрированный буферный раствор)	свежеприготовленный
15.	формаид высокоочищенный, деионизованный для денатурации нуклеиновых кислот перед капиллярным электрофорезом «Hi-Di™ Formamide» (Applied Biosystems, США)	-
16.	Септы (антииспарители) на емкостях с жидкостями и на планшете	новые

Возможность проведения поверки отдельных измерительных каналов для меньшего числа величин или на меньшем числе поддиапазонов измерений для данных СИ не предусматривается

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

2 Требования к квалификации поверителей

К выполнению поверки допускаются лица, аттестованные в качестве поверителя в установленном порядке, владеющие методом анализа, знающие принцип действия, конструкцию и правила эксплуатации анализаторов.

3 Требования безопасности

Все токоведущие части должны быть защищены от случайного прикосновения.

Металлические нетоковедущие части, которые могут вследствие повреждения изоляции оказаться под электрическим напряжением опасной величины, должны быть заземлены по ГОСТ 12.2.007.0-75.

Подаваемое напряжение питания должно соответствовать указанному на заводской бирке прибора. Аварийный выключатель напряжения питания должен быть четко обозначен и расположен вблизи прибора.

Эксплуатация оборудования, имеющего повреждения, не допускается.

Устранение любых неисправностей должно выполняться только специально обученным персоналом соответствующей квалификации.

4. Условия проведения поверки и подготовка к ней

4.1 При проведении поверки должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление (80 – 120) кПа;
- относительная влажность от 30 % до 80 % при температуре 30 °С;
- напряжение питания 220 В.

5. Проведение поверки:

5.1 Внешний осмотр

При внешнем осмотре устанавливают соответствие следующим требованиям:

- отсутствие механических повреждений корпуса анализаторов и их лицевой панели;
- отсутствие механических повреждений разъемов;
- наличие на корпусе необходимой маркировки.

Кроме того, проверяется наличие эксплуатационной документации, входящей в комплект поставки анализаторов (паспорт и руководство по эксплуатации).

Результаты поверки признаются положительными, если маркировка нанесена на лицевую панель анализаторов и включает товарный знак предприятия-изготовителя, наименование и условное обозначение типа анализаторов.

5.2 Опробование

Опробование анализатора проводят не ранее, чем через 10 мин после его подключения к источнику питания, и после осуществления всех необходимых соединений.

Включите компьютер, при необходимости введите пароль. Перед включением прибора убедитесь, что: дверца термостата капилляров закрыта; дверцы прибора закрыты; внутри рабочего пространства прибора не находится посторонних предметов.

Включите прибор нажатием кнопки «СЕТЬ». Дождитесь постоянного желтого и зеленого цветов лампочек на передней панели прибора. На рабочем столе компьютера запустить программу НАНОФОР 05. Дождитесь постоянного желтого и мигающего зеленого цветов лампочек на передней панели прибора. Мигающая зеленая лампочка сигнализирует о успешном установлении соединения прибора с программой НАНОФОР 05. При положительных результатах анализатор признаётся работоспособным.

5.3. Определение идентификационных данных программного обеспечения

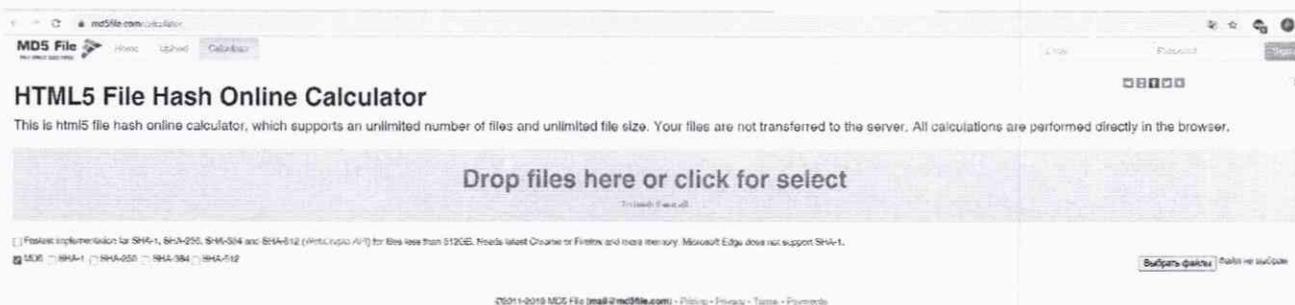
При определении идентификационных данных программного обеспечения определяется соответствие программного обеспечения таблице 3.

Таблица 3-Идентификационные данные ПО

Идентификационные данные (признаки)	Значения			
Идентификационное наименование ПО	НАНОФОР 05	ДНК Анализ	ПАР2СЕК	ДНК ФА
Номер версии (идентификационный номер) ПО	не ниже 1.0.1.143	не ниже 5.0.3.3	не ниже 1.5.0	не ниже 5.0.1.6
Цифровой идентификатор ПО	1C29DFC7BAA549AEE21923A647270DC8	5907C8F5609C9BBB8303FB5D27DFCAAC	2A2A67A39DB7A1C4E4323BBEDA0E3B3F	-
Алгоритм вычисления цифрового идентификатора ПО	MD5	MD5	MD5	-
Примечание: метрологически значимый файл	SeqDataProcessing.dll	seqmtl.dll.	SequenceLogicData.dll	ПО не является метрологически значимым

Для вычисления цифрового индентификатора ПО необходимо:

- Скопировать соответствующие метрологически значимые файлы (см таблицу выше) на USB-флеш-накопитель
- Перенести файлы на компьютер, имеющий доступ к сети интернет
- Открыть калькулятор MD5 располагающийся по адресу <https://md5file.com/calculator>
- Поставить галочку на MD5



-Нажать на кнопку – **Выбрать файл.**

- Выбрать соответствующий файл для вычисления цифрового идентификатора. Значение цифрового идентификатора появится сразу же после загрузки файла.

5.4 Определение метрологических характеристик

Определение метрологических характеристик анализатора проводятся посредством сличения результата измерений нуклеотидной последовательности стандартного образца, полученного при измерении на анализаторе, с аттестованным значением данного стандартного образца.

Лабораторное испытание состоит из следующих этапов:

- электрофоретическое разделение продуктов секвенирования ДНК методом капиллярного электрофореза, установление нуклеотидной последовательности.
- сравнение полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, с паспортом образца.

5.4.1 Электрофоретическое разделение продуктов секвенирования ДНК методом капиллярного электрофореза, установление нуклеотидной последовательности.

Подготовьте «Рабочую смесь» продукта реакции секвенирования ГСО в соответствии с инструкцией производителя Стандартного образца. Осуществите загрузку рабочей смеси как указано ниже.

5.4.1.1. Загрузка «Рабочей смеси»

Приготовить и подписать 96-луночный планшет, как на рис.1.

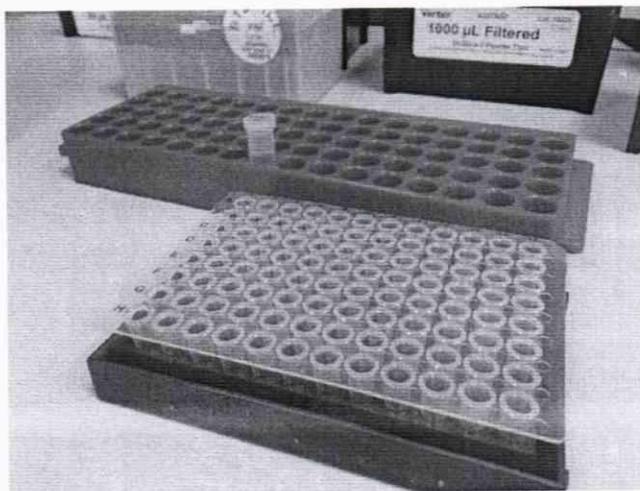


Рисунок 1-Подготовка планшета.

Внести по 10 мкл «Рабочей смеси» (или иной объем Рабочей смеси, указанный производителем Стандартного образца) в ряд 1 планшета. Закрывать планшет резиновой септой- антииспарителем (Рис.2)

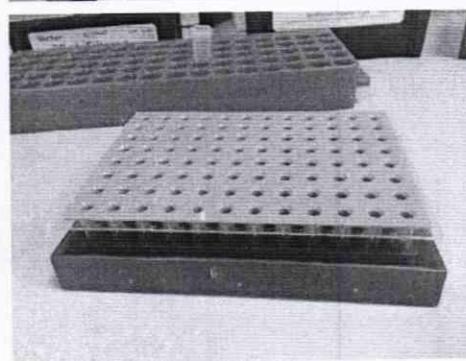
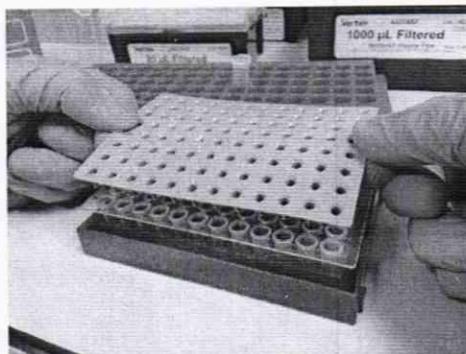
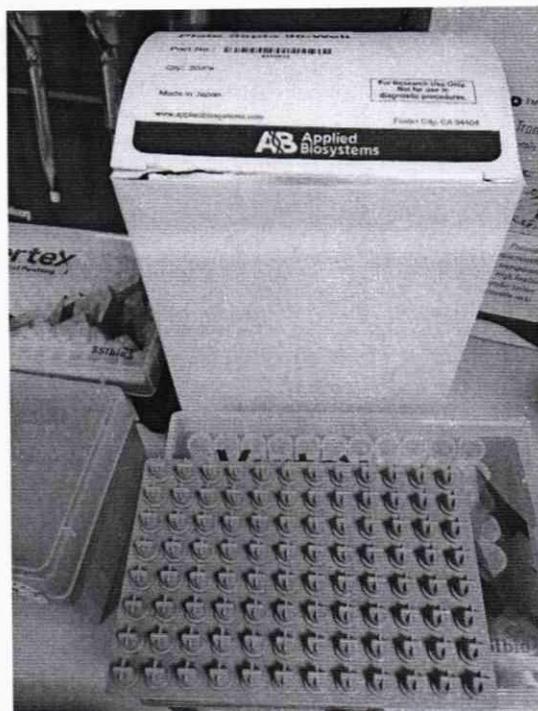


Рисунок 2-Загрузка рабочей смеси

Открутить планшет (для осаждения капель со стенок) на центрифуге типа Eppendorf 5810R, с ротором для 96 луночных планшетов, при 2000 об/мин в течение 1 мин. Либо с использованием аналогичной центрифуги.

Денатурировать Рабочую смесь в амплификаторе в соответствии с программой денатурации, рекомендованной производителем Стандартного образца. Денатурацию образцов проводить при открытой крышке амплификатора, чтобы предотвратить нежелательное воздействие крышки амплификатора на резиновую септу-антииспаритель.

Снять образцы с амплификатора. Убедиться в отсутствии пузырей в лунках с образцами. В случае наличия пузырей в лунках или на капель на стенках лунок – кратко центрифугировать планшет.

Поместить планшет в держатель планшета. Убедиться в том, что нумерация лунок на планшете и на держателе планшета совпадает (рис.3).

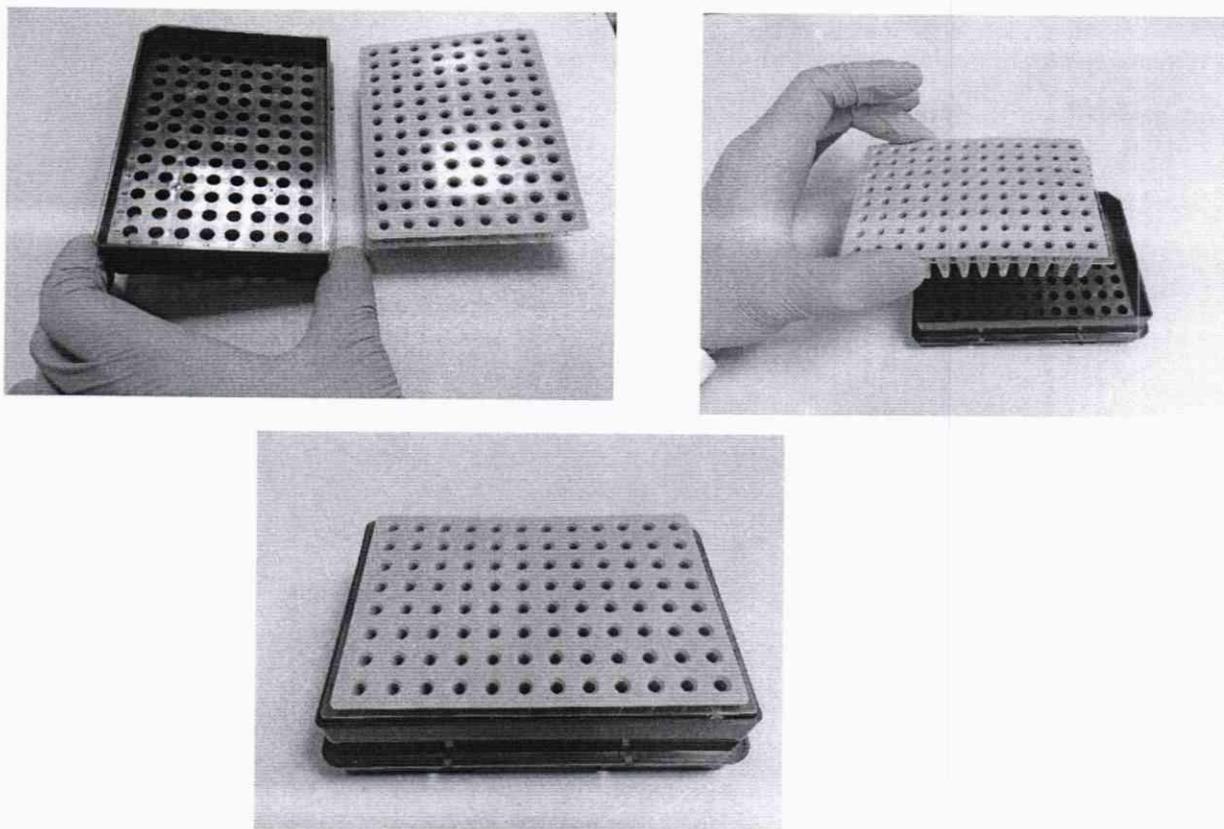


Рисунок 3 –Установка планшета в держатель

Убедиться в наличии антииспарителя на планшете. При помощи фиксатора планшета зафиксировать планшет на держателе. Для этого поместить фиксатор на держатель, слегка раздвинуть боковые крепления и надавить до характерного щелчка. Как показано на рисунке ниже.

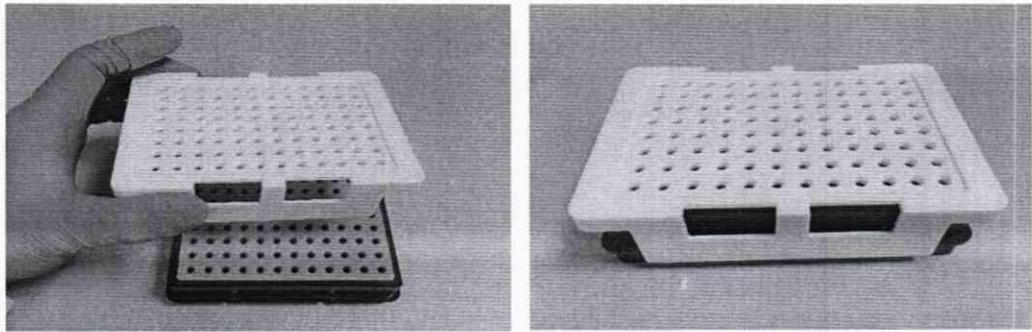


Рисунок 4- Контроль сборки планшета

Убедиться, что планшет с образцами, антииспаритель и фиксирующая крышка находятся в правильной сборке (то есть отверстия в фиксирующей крышке, антииспарителе и отверстия лунок с образцами совмещены) – Рис. 3-4

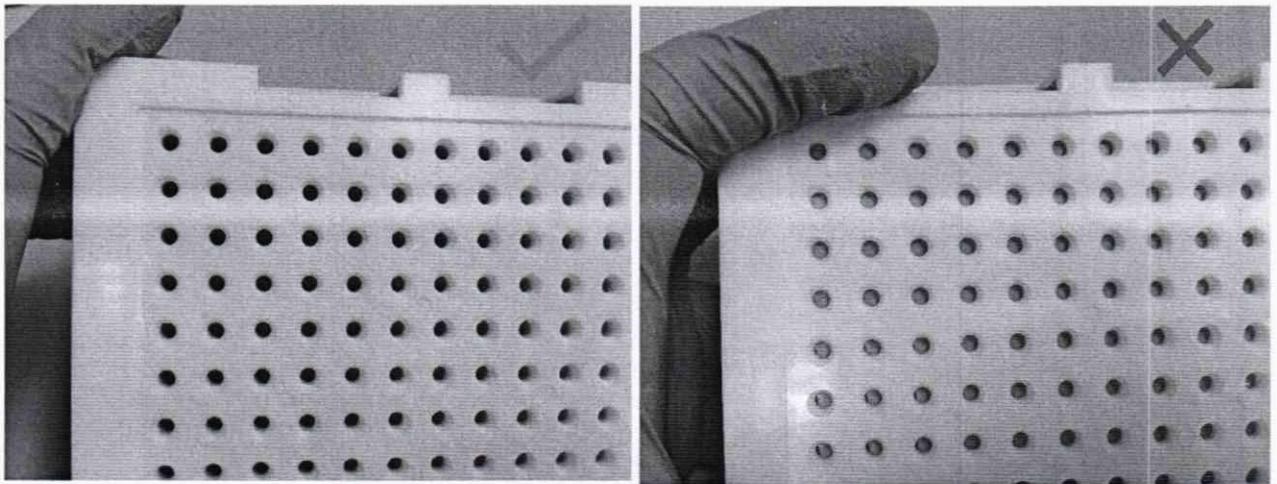


Рисунок 5- Контроль сборки планшета

5.4.1.2 Электрофоретическое разделение и детекция на приборе Нанофор 05

- Проверить объем буфера и воды в емкостях, включая анодный буфер (объем должен доходить до метки);
- Проверить отсутствие пузырей в блоке заполнения полимером и всех каналах, заполненных полимером. При необходимости удалить пузыри;
- Убедиться, что планшет с образцами, антииспаритель и фиксирующая крышка находятся в правильной сборке (то есть отверстия в фиксирующей крышке, антииспарителе и отверстия лунок с образцами совмещены);
- Проверить состояние капилляров со стороны позиционера-держателя на предмет их повреждения или загиба;
- Проверить уровень полимера в емкости с полимером.

На приборе нажать кнопку «Tray – Загрузка». Позиционер выдвинется в положение – к оператору. Дождаться, пока позиционер прекратит движение. Открыть дверцы прибора и установить сборку планшет на позиционер.

Закрывать дверцы прибора. Позиционер с установленным в держателе планшетом/стрипом отправится в рабочее положение.

На компьютере запустить управляющую программу «Нанофор-05», выбрать «Файл» - > «Новый проект».

В появившемся окне «Свойства проекта» ввести имя оператора и название проекта, нажать кнопку «Принять».

В открывшемся окне «Описание проекта» присваиваем название образцов тем ячейкам, где они находятся. Для этого левой кнопкой мыши кликаем на нужную ячейку и вводим название образца. Для перемещения между ячейками можно использовать стрелки клавиатуры или клавишу Enter.

Далее необходимо задать Программу анализа. Для этого в строке «ПА» дважды кликаем левой кнопкой мыши на ячейку под нужным рядом.

В открывшемся окне «Программа анализа» выбрать «Тип анализа» – Сиквенсный. Далее в строке «Модуль управления» из выпадающего списка выбрать **Seq_PDMA6_50_Standard**. Убедитесь в правильности параметров модуля управления. Если какой-либо параметр был изменен, ввести верное значение согласно таблице 4.

Таблица 4 –Параметры модуля управления

1	Температура первого термостата	60
2	Температура второго термостата	60
3	Напряжение префореза В	15000
4	Время префореза сек	180
5	Напряжение ввода пробы В	3000
6	Время ввода пробы	30*
7	Напряжение электрофореза	10500
8	Время электрофореза	6500
9	Время исключения регистрации электрофореза	1700
10	Длит шага высокого при фореze, сек	30
11	Скорость шприца при подготовке к фореze (Шаг/сек)	4
12	Число шагов шприца при подготовке к фореze	1200
13	Число шагов после фореze	20
14	0 не включать термостат, =1 включать	1

15	0 не включать второй термостат, =1 включать	1
16	Время исследования	1ч 59 мин

* **Примечание.** Параметр «*Время ввода пробы*» допустимо изменять в диапазоне от 5 сек до 60 сек для корректировки высоты сигнала. Оптимальное значение сигнала от 100 000 до 600 000 относительных флуоресцентных единиц.

Далее в строке **Набор красителей** необходимо нажать «**Выбрать**». Выбрать в графе **Набор Thermo_BigDye_v3.1**, а в графе **Калибровка** выбрать калибровку (качество должно быть Хорошее). Нажать кнопку «**Принять**».

В окне «**Описание проекта**» нажать кнопку «**Принять**». Откроется главное окно программы «**Нанофор-05**» и в графе *Статус* в выбранном ряду планшета появится надпись «**Готов к анализу**».

Для запуска анализа, после описания всех загруженных образцами рядов планшета, в меню главного окна программы «**Нанофор-05**» нажать кнопку **Запустить** или в пункте меню **Действия** выбрать опцию **Запустить**. Активируется главное окно программы «**Нанофор-05**». Первый анализируемый ряд планшета выделится зеленым цветом, а в графе статус появится надпись *Измерение*. В нижней части окна рядом с надписью *Лазер* серый индикатор должен стать красным – это означает, что лазер включен. В конце строки *Текущая* отобразится время до конца текущего анализа, а в конце строки - *Все* – время до конца анализа всей планшета.

Необработанные данные формата *sgd* содержащие сырые данные секвенирования сохраняются на диске D (папка D:\НАНОФОР 05\Data).

Провести анализ необработанных данных для получения последовательности с использованием программы ДНК АЛ. Для анализа необработанных данных в программе ДНК АЛ открыть файлы формата *sgd*, полученные согласно инструкции, приведенной выше. Проанализировать образцы: выбрать в Меню Сервис – «Анализировать все».

Сохранить проанализированные образцы в формате *dan*: Меню Файл – «Сохранить как» – Тип файла: файлы анализа *dan* – «Сохранить».

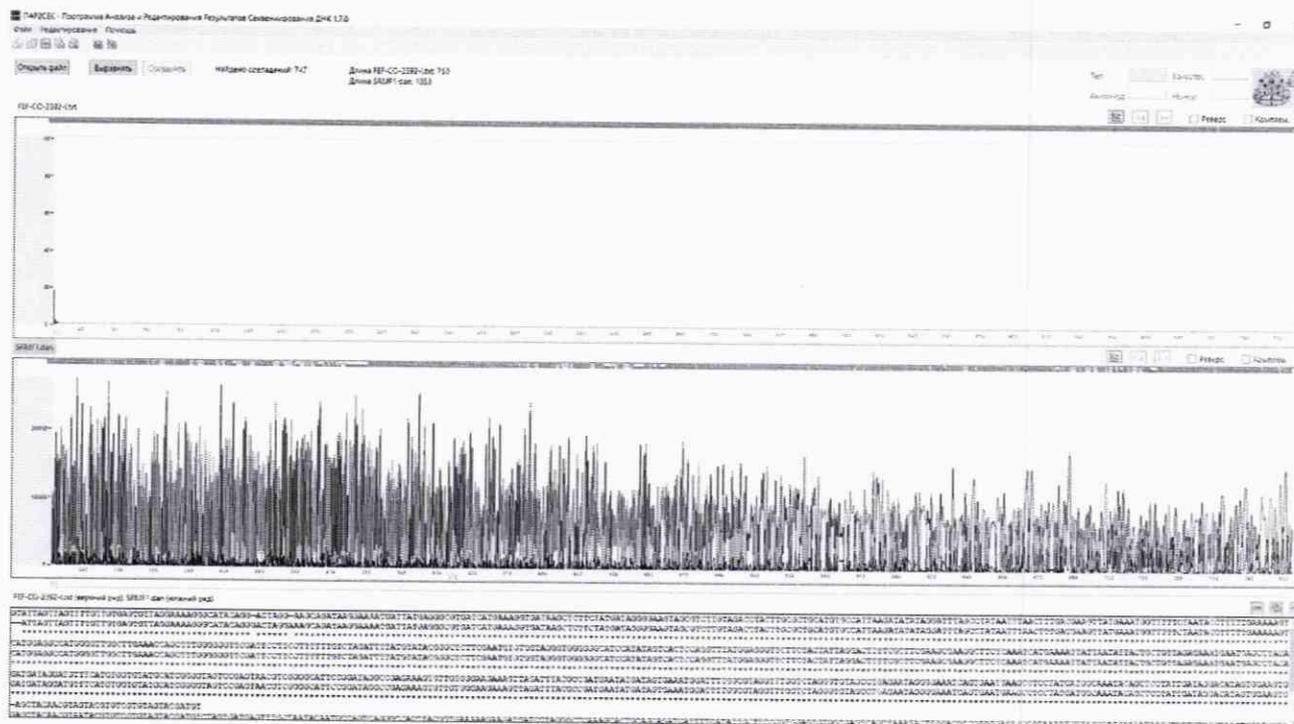
5.4.2 Сравнение полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из анализируемой пробы, с паспортом образца.

5.4.2.1 Определить точность прочтения непрерывной последовательности ДНК (контрольный регион митохондриальной ДНК Стандартного образца) до 750 нуклеотидов. Для определения точности прочтения сравнивают полученную нуклеотидную последовательность ГСО с последовательностью, приведенной в паспорте ГСО.

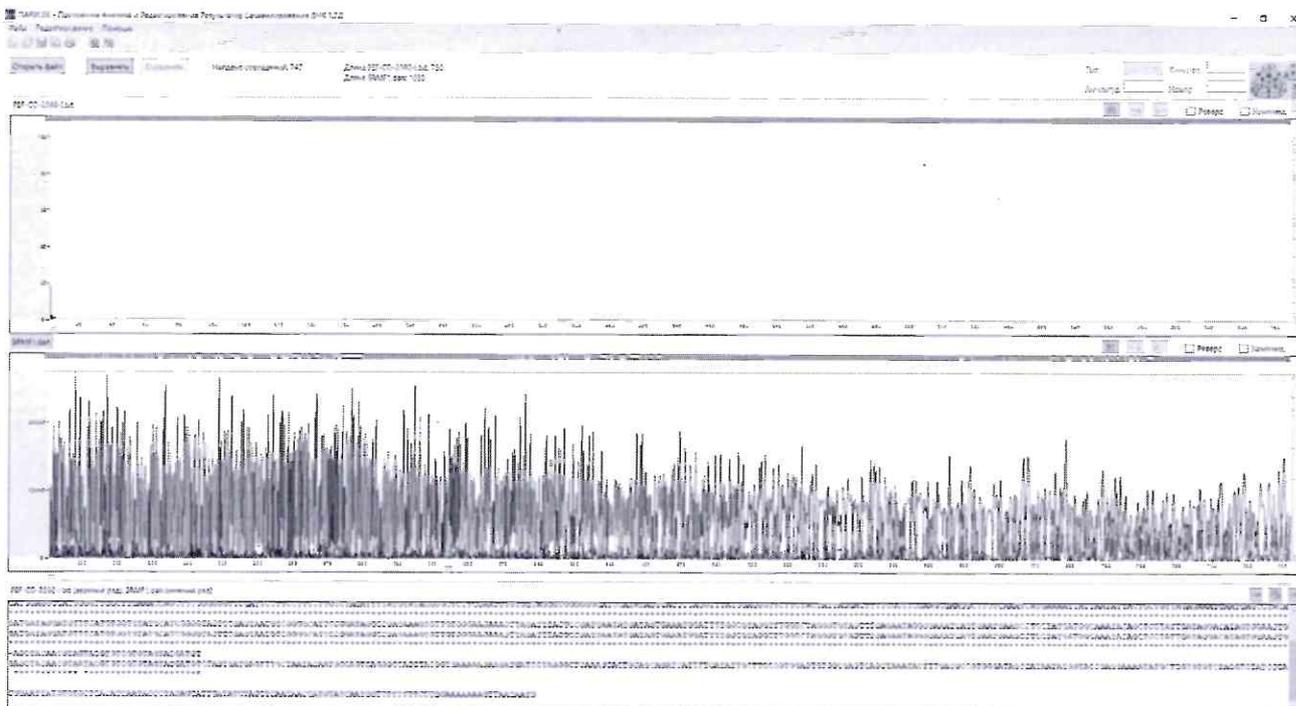
5.4.2.2 Открыть программу ПАР2СЕК

Выбрать в Меню Файл – «Открыть файл» - файл для анализа в формате проанализированных данных dan. Откроется электрофореграмма и текстовая последовательность образца. Выбрать в Меню Файл – «Открыть файл» - файл с последовательностью стандартного образца длиной 750 нуклеотидов, в формате txt. Откроется текстовая последовательность Стандартного образца.

Запустить выравнивание последовательностей нажатием кнопки «Выровнять». Окно программы примет следующий вид:



Вид при прокручивании нижней части окна:



В нижней части окна программы PAR2SEK будут выравнены друг относительно друга измеренная последовательность и последовательность из паспорта ГСО.

Для каждого из 8 полученных файлов подсчитать количество совпадений (совпадения отмечены символом «*») и несовпадений на протяжении 750 нуклеотидов последовательности.

Исключить из анализа файл с наибольшим количеством несовпадений и файл с наименьшим количеством несовпадений. Относительная погрешность вычисляется по формуле (1):

$$\delta = \frac{N-n}{N} * 100\% \quad (1)$$

где N – общее число выровненных позиций двух нуклеотидных последовательностей, n – число совпадающих оснований в выровненных позициях двух нуклеотидных последовательностей.

Анализатор считается прошедшим поверку, если пределы допускаемой относительной погрешности прочтения непрерывной последовательности ДНК ГСО не превышает $\pm 1,5\%$.

5.4.3 Погрешность измерений массовой доли нуклеотидов

Определяют из анализа прочитанной последовательности, приведенной в паспорте на ГСО. Для каждого нуклеотида подсчитывается количество букв в последовательностях по формуле (2):

$$M = (K_y \cdot M_{\text{нукл}} \cdot 100) / n \quad (2)$$

где K_y – количество каждого из нуклеотидов в последовательности.

(Y обозначение нуклеотида, который является тетритом – единицей измерений нуклеотида, принимает 4 значения А, G, C, T),

$M_{\text{нукл}}$ – молярная масса каждого нуклеотида, г/моль;

n –выровненная длина последовательности (750 нуклеотидов).

Относительную погрешность измерений массовой доли вычисляют по формуле:

$$\delta = (M_y - M_{yг}) * 100 / M_{yгсо} \quad (3)$$

где M_y – массовая доля нуклеотида в прочитанной последовательности,

$M_{yгсо}$ – массовая доля в соответствующем фрагменте ГСО.

Анализатор считается прошедшим поверку, если относительная погрешность измерений массовой доли не превышает 1,5 %.

6. Оформление результатов поверки

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

6.2. Если анализатор по результатам поверки признан непригодным к применению, «Свидетельство о поверке» аннулируется, выписывается «Извещение о непригодности».

6.3. После ремонта анализатор подвергают поверке.

Начальник лаборатории 009 ФГУП «ВНИИМС»

Е.В. Кулябина

Ведущий инженер лаборатории 009 ФГУП «ВНИИМС»

О.Н. Мелкова