

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора ФГБУ «ВНИИМС»

Ф.В. Булыгин

« 27 » 12 2023 г.



Государственная система обеспечения единства измерений

Модули измерительные Quant Gene 9600 в составе термоциклеров
для амплификации нуклеиновых кислот FQD-96C

Методика поверки

009-41-23 МП

Москва
2023 г.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Настоящая методика распространяется на Модули измерительные Quant Gene 9600 в составе термоциклеров для амплификации нуклеиновых кислот FQD-96C (далее – модули) и устанавливает методику их первичной и периодических поверок.

Используемые средства поверки обеспечивают прослеживаемость модулей к ГПЭ единиц массовой (молярной доли) и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии ГЭТ 208-2019 в соответствии с ГПС для СИ содержания органических и элементарноорганических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах, утвержденной приказом Росстандарта № 988 от 10 июня 2021 года.

Метод поверки включает применение средств измерений и стандартного образца утвержденного типа, приготовление контрольных растворов с известной концентрацией, определение относительного среднего квадратического отклонения результатов измерений.

В результате поверки должны быть подтверждены следующие метрологические требования, приведенные в таблице 1.

Таблица 1

Наименование характеристики	Значение
Диапазон измерений массовой доли ДНК, г/кг	от 1 до 50
Пределы допускаемой относительной погрешности измерений массовой доли ДНК, %	± 25
Предел допускаемого СКО результатов измерений, %	15

1 ПЕРЕЧЕНЬ ОПЕРАЦИЙ ПОВЕРКИ

1.1 При проведении поверки должны выполняться операции, указанные в таблице 2

Таблица 2

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер пункта методики, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
1. Внешний осмотр	Да	Да	6
2. Подготовка к поверке и опробование	Да	Да	7
3. Проверка программного обеспечения	Да	Да	8

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер пункта методики, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
4. Определение метрологических характеристик и подтверждение соответствия средства измерений метрологическим требованиям	Да	Да	9
5. Оформление результатов поверки	Да	Да	10

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

2 ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

При проведении поверки соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С от +18 до +25
- атмосферное давление, кПа от 84 до 106,0
- относительная влажность воздуха, % от 20 до 60

3 ТРЕБОВАНИЯ К СПЕЦИАЛИСТАМ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИМ ПОВЕРКУ

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица, владеющие методом ПЦР анализа, знающие принцип действия, конструкцию и правила эксплуатации модулей.

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

4 МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ПОВЕРКИ

При проведении поверки применяют основные и вспомогательные средства поверки, указанные в таблице 3.

Таблица 3

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
п. 7.2 Проверка условий проведения поверки	Средства измерений температуры окружающего воздуха в диапазоне от 0 до +50 °С, предел допускаемой погрешности измерений $\pm 0,5$ °С Средства измерений относительной влажности окружающего воздуха в диапазоне от 5 % до	Измеритель комбинированный Testo 176-P1, рег. №48550-11

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
	95 %, предел допускаемой абсолютной погрешности ± 2 %, Средства измерений атмосферного давления в диапазоне от 600 до 1100 мбар, предел допускаемой абсолютной погрешности ± 3 мбар	
7.1 Подготовка контрольных растворов – Приложение 1	Средства измерений переменного объема от 20 до 200 мкл, предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения фактического объема дозы 3,0 % Средства измерений переменного объема от 100 до 1000 мкл, предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения фактического объема дозы 1,0 % Средства измерений переменного объема от 0,5 до 10 мкл, предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения фактического объема дозы 7,0 %	Дозаторы пипеточные Eppendorf Research Plus одноканальные с переменным объемом дозирования, рег. №55543-13
п. 9 Определение метрологических характеристик средства измерений	СО с аттестованным значением массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои с границами относительной погрешности (при $P=0,95$) ± 12 %	ГСО 9866-2011 состава ДНК сои (КОМПЛЕКТ ГМ-СОЯ-ВНИИМ).
	Вспомогательное оборудование: Микроцентрифуга-вортекс 2400 об/мин FV-2400; ПЦР-бокс (защитная камера с УФ-лампой) настольный с рециркуляцией воздуха UVT-S-AR; Набор реагентов для идентификации ГМ линий GTS 40-3-2 и выявления ДНК сои методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «Соя /GTS 40-3-2», ООО «Тест-реагент», Россия	
Примечание - Допускается использовать при поверке другие утвержденные и аттестованные эталоны единиц величин, средства измерений утвержденного типа и поверенные, утвержденного типа стандартные образцы, удовлетворяющие метрологическим требованиям, указанным в таблице.		

5 ТРЕБОВАНИЯ (УСЛОВИЯ) ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

При проведении поверки выполняют требования безопасности, изложенные в руководстве по эксплуатации на модули.

При утилизации отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, в целях предотвращения контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

При работе с СО необходимо использовать одноразовые перчатки, которые

подлежат смене при каждой новой операции. Работа без перчаток не допускается на всех этапах постановки ПЦР.

6 ВНЕШНИЙ ОСМОТР СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

При внешнем осмотре устанавливают:

- соответствие комплектности поверяемого модуля требованиям эксплуатационной документации;
- четкость маркировки;
- исправность механизмов и крепёжных деталей;
- отсутствие видимых механических повреждений, влияющих на работоспособность модулей.

7 ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ И ОПРОБОВАНИЕ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

Перед проведением поверки выполняют следующие подготовительные работы.

7.1 Готовят растворы согласно Приложению 1.

7.2 Проверяют условия проведения поверки.

7.3 Опробование.

Модули готовят к работе в соответствии с разделом 4 руководства по эксплуатации. Результаты опробования считают положительными, если после выхода на режим не появляются информационные сообщения программного обеспечения, указывающие на возникновение фатальных ошибок.

8 ПРОВЕРКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

Метрологически значимым файлом является файл QGene96.exe, расположенный на рабочем столе (Desktop). Расположение файла: «C:\Bioer\QGene96\bin\QGene96.exe».

После запуска программного обеспечения на экране выводится начальный экран (рисунок 1) с которого ведется управление.

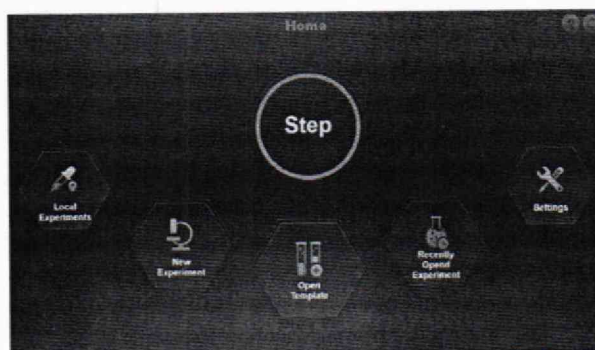


Рисунок 1 - Начальный экран программного обеспечения

На главном экране программного обеспечения заходим во вкладку «Settings» - рисунок 2.

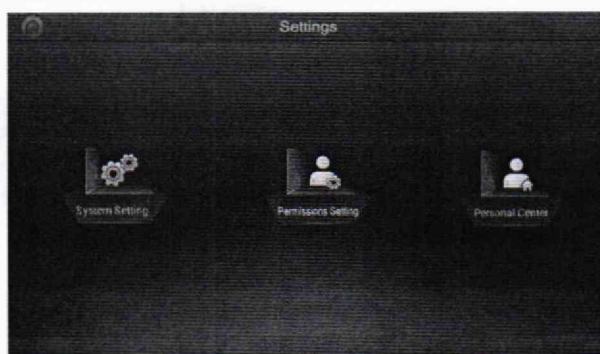


Рисунок 2 – Открытая вкладка «Settings»

Во вкладке «Settings» необходимо открыть вкладку «System Setting» - рисунок 3.

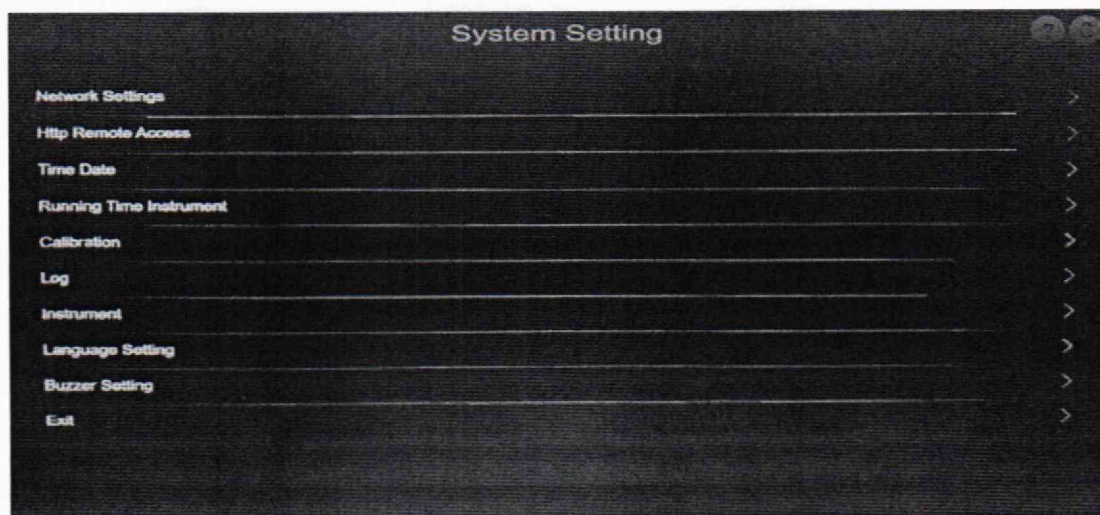


Рисунок 3 – Открытая вкладка «System Setting»

Для того чтобы увидеть версию ПО открываем вкладку «Instrument» - рисунок 4.

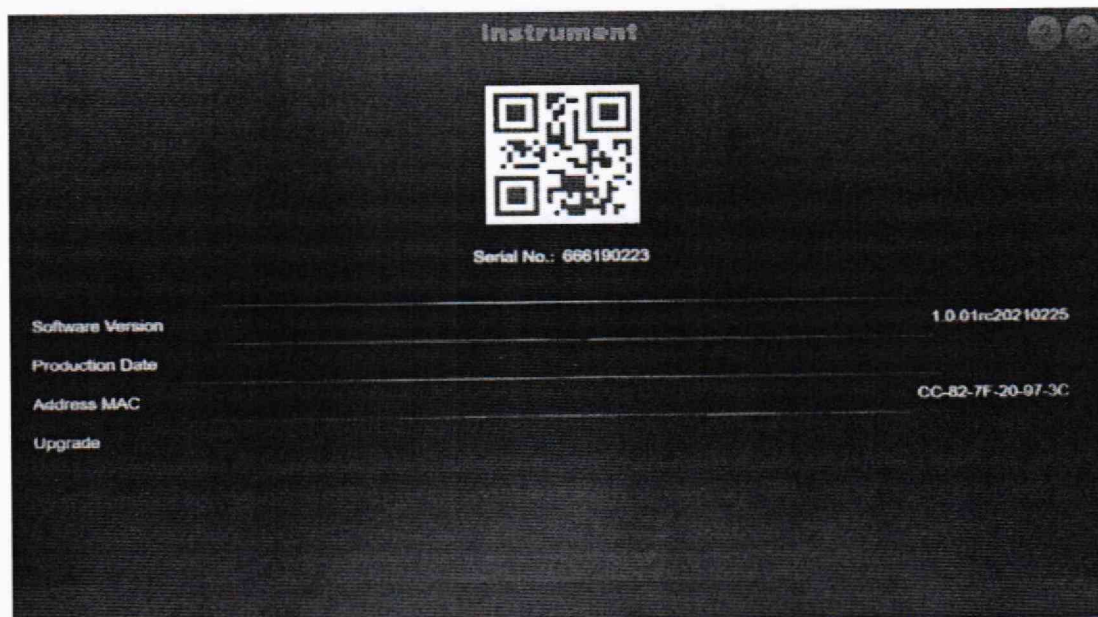


Рисунок 4 – Открытая строка «Instrument»

В строке «Instrument» можно увидеть версию ПО: «Software Version».

Для вычисления контрольной суммы программы необходимо нажатием комбинации клавиш «Win+R» открыть командную строку → ввести команду «cmd» →

ввести команду «certutil -hashfile» ввести путь к программе «C:\Bioer\QGene96\bin\QGene96.exe» и алгоритм вычисления «MD5». В итоге должно получиться «certutil -hashfile C:\Bioer\QGene96\bin\QGene96.exe MD5», нажимаем «Enter» → получаем контрольную сумму ПО стандартным алгоритмом MD5 (рисунок 5).

```
C:\Users\admin>certutil -hashfile C:\Bioer\QGene96\bin\QGene96.exe MD5
MD5 hash of C:\Bioer\QGene96\bin\QGene96.exe:
cbeacfd76bd023f8456ea238fa472e2
CertUtil: -hashfile command completed successfully.
```

Рисунок 5 – Результат вычисления контрольной суммы метрологически значимого файла

Цифровой идентификатор ПО и номер версии должны соответствовать приведенным в таблице 5.

9 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ МЕТРОЛОГИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ

9.1 Определение значений концентраций образцов.

Приготовить растворы ГСО согласно Приложению 1. В соответствии с Таблицей 4 в каждую микропробирку для проведения ПЦР внести по 15 мкл реакционной смеси и по 10 мкл: исследуемого образца (К1) в 5 пробирок, стандартных образцов (Ст1, Ст2, Ст3) каждого в две пробирки, и отрицательного контроля (ОКО) в 2 пробирки.

Таблица 4

Образец	Количество пробирок	Добавляемый раствор
Ст1	2	ГМ-Соя-ВНИИМ-5
Ст2	2	ГМ-Соя-ВНИИМ-1
Ст3	2	ГМ-Соя-ВНИИМ-0,1
К1	5	ГМ-Соя-ВНИИМ-5, разведенный в пропорции 1:2
ОКО	2	ТЕ-буфер

9.1.2 Закрывать пробирки крышкой, поместить в прибор в следующей последовательности: Ст1 – 2 шт., Ст2 – 2 шт., Ст3 – 2 шт., К1 – 5 шт., ОКО – 2 шт., закрыть крышку прибора.

9.1.3. Запрограммировать прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени согласно Приложению 2.

9.1.4. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**.

9.1.5. Получить значения концентраций для всех образцов.

9.1.6. Данные внести в протокол.

9.2 Определение относительной погрешности результатов измерений массовой доли ДНК и предела допускаемого СКО результатов измерений массовой доли ДНК.

9.2.1. Для перевода значений концентраций из пг/мл в г/кг, необходимо значения концентраций, полученные в результате проведения ПЦР в реальном времени, умножить на 1 000 000 000.

9.2.2. Относительная погрешность определения массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в СО ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1 вычисляется по формуле:

$$\delta = \frac{(P - \bar{C})}{P} \times 100\% \quad (1)$$

где P – значение массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в СО ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1 по паспорту, \bar{C} – среднее значение массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в СО ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1, измеренное в п. 9.1. Результат вычислений заносится в протокол.

9.2.3. Вычисляют относительное СКО результатов измерений по формуле (2):

$$\sigma = \frac{100}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (2),$$

где X_i – i -ое значение результата измерений;

n – число измерений;

\bar{X} – среднее арифметическое значений массовой доли ДНК генетически модифицированной сои, полученных в ходе измерений образца К1.

9.3 Подтверждение соответствия СИ метрологическим требованиям

Модули считаются прошедшими поверку, если выполняются условия, изложенные в пунктах 9.3.1-9.3.4.

9.3.1 Условия поверки соответствуют п. 2.

9.3.2 Результаты проверки ПО соответствуют приведенным в таблице 5.

Таблица 5 – Идентификационные данные программного обеспечения

Идентификационные данные (признаки)	Значение
Наименования программного обеспечения	BIOER software
Идентификационное наименование ПО	BIOER
Номер версии (идентификационный номер) ПО	1 и выше
Цифровой идентификатор ПО	cbeacfd76bd028f8456ea238fa472e2
Алгоритм вычисления цифрового	MD5

9.3.3 Диапазон измерений массовой доли ДНК от 1 до 50 г/кг.

9.3.4 Значения допускаемой относительной погрешности измерений массовой доли ДНК не более $\pm 25\%$.

9.3.5 СКО определения массовой доли ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 в ДНК натуральной сои в образце ГМ-СОЯ-ВНИИМ-1 не превышает 15 %.

10 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

10.1 Результаты поверки заносят в протокол, форму протокола устанавливает поверитель.

10.2 Положительные результаты поверки модулей оформляют в соответствии с приказом Минпромторга России № 2510 от 31.07.2020 г.

10.3 При отрицательных результатах модули признаются непригодными к применению в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений и оформляют результаты поверки в соответствии с приказом Минпромторга России № 2510 от 31.07.2020 г.

10.4 Сведения о результатах поверки передаются в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений.

10.5 При наличии письменного заявления владельца или лица, предоставляющего модули на поверку, свидетельство о поверке СИ или извещение о непригодности к применению СИ оформляются на бумажном носителе или в виде электронного документа (при наличии технической возможности).

Начальник лаборатории



Е.В. Кулябина

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

Методика предназначена для приготовления контрольных растворов ДНК генетически модифицированной сои

1. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ

- 1.1. Дозаторы пипеточные Eppendorf Research Plus одноканальные с переменным объемом дозирования от 100 до 1000 мкл, от 20 до 200 мкл и от 0,5 до 10 мкл;
- 1.2. Микроцентрифуга-вортекс 2400 об/мин FV-2400;
- 1.3. ПЦР-бокс (защитная камера с УФ-лампой) настольный с рециркуляцией воздуха UVT-S-AR;
- 1.4. Набор реагентов для идентификации ГМ линий GTS 40-3-2 и выявления ДНК сои методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «Соя/GTS 40-3-2», ООО «Тест-реагент», Россия;
- 1.5. ГСО 9866-2011 состава ДНК сои (КОМПЛЕКТ ГМ-СОЯ-ВНИИМ) – 1 шт.;
- 1.6. Пробирка 1,5 мл – 1 штука;
- 1.7. Пробирки 0,5 мл – 1 штук;
- 1.8. Пробирки 0,2 мл – 13 штук;
- 1.9. Вода деионизированная.

2 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

2.1 Приготовление реакционной смеси

2.1.1. Подготовить набор реагентов в соответствии с инструкцией по применению. Подготовить пробирку (1,5 мл) для приготовления реакционной смеси.

2.1.2. Подготовить пробирку (0,5 мл) для приготовления исследуемого образца и подписать К1.

2.1.3. Подготовить 13 микропробирок (0,2 мл) для проведения ПЦР, подписать на боку пробирок: Ст1 – 2 шт, Ст2 – 2 шт, Ст3 – 2 шт, К1 – 5 шт, ОКО – 2 шт. Писать на крышках пробирок запрещено!

2.1.4. Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-1 «Соя/GTS 40-3-2» и ПЦР-буфером, перемешать на вортексе и сбросить капли путем кратковременного центрифугирования.

2.1.5. Для проведения 13 реакций смешать в отдельной пробирке (1,5 мл) 140 мкл ПЦР-смеси-1 «Соя/GTS 40-3-2», 70 мкл ПЦР-буфера и 7 мкл NS Taq-полимеразы, перемешать смесь на вортексе и сбросить капли путем кратковременного центрифугирования.

2.1.6. Внести по 15 мкл реакционной смеси в 13 пробирок (0,2 мл).

2.2. Приготовление контрольного образца.

2.2.1. Разморозить пробирку с ГСО 9866-2011 «ГМ-Соя-ВНИИМ-5», тщательно перемешать на вортексе и сбросить капли путем кратковременного центрифугирования.

2.2.2. Развести ГСО 9866-2011 «ГМ-Соя-ВНИИМ-5» в пропорции 1:2 (1 часть ГСО, 2 части воды)

2.2.3. Внести в пробирку (0,5 мл) 80 мкл воды и 40 мкл раствора ГСО 9866-2011 «ГМ-Соя-ВНИИМ-5», перемешать на вортексе и сбросить капли путем кратковременного центрифугирования (К1, контрольный образец).

2.2.4. Внести по 10 мкл контрольного образца в 5 пробирок (0,2 мл).

2.3. Приготовление отрицательного контрольного образца.

2.3.1. Разморозить пробирку ОКО из набора «Соя/GTS 40-3-2», тщательно перемешать на вортексе и сбросить капли путем кратковременного центрифугирования.

2.3.2. Внести по 10 мкл отрицательного контрольного образца в 2 соответствующие пробирки (0,2 мл).

ПОРЯДОК

действий по получению отчета с использованием программы

1. Запустить программу **QGene96.exe**. В стартовом окне необходимо выбрать **New Experiment – Absolute**.
2. Во вкладке **Detector** в окне **Experiment Name** необходимо задать имя файла.
3. В столбце **Reported** добавить каналы **JOE** и **ROX** (для добавления каналов использовать кнопку **Add Detector**).
4. Во вкладке **Sample** в графе **Sample ID** задать наименования образцов.
5. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** задать расположение пробирок в модуле, выбрать красители **ROX** и **JOE**, выбрать **Unknown** для проб К1 и ОК0, выбрать **Standart** для проб Ст1, Ст2, Ст3. В качестве единиц измерения выбрать пг/мл.
6. Задать значения концентраций для стандартов Ст1, Ст2, Ст3. Значения концентраций для стандартов задать те, которые указаны в паспорте к действующему ГСО, с помощью которого проводится поверка.
7. Во вкладке **Program** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Volume – 25 мкл**.
8. Задать в программе **QGene 96** следующие параметры эксперимента:

- Hold/Удерж. темп-ры	95 °С – 15 мин
- Cycling/Циклирование	95 °С – 15 с
- Детектирование	60 °С – 60 с
- Cycle repeats/Цикл повторить	40 times/раз