

ФГУ «РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР ИСПЫТАНИЙ И СЕРТИФИКАЦИИ  
РОСТЕСТ – МОСКВА»

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель ГЦИ СИ  
ФГУ «Ростест-Москва»,  
зам. генерального директора  
\_\_\_\_\_ А.С.Евдокимов

“ “ \_\_\_\_\_ 2007 г.

Системы для проведения ПЦР в режиме реального времени моделей:  
«iQ», «iQ5», «Mini Opticon» и «Chromo-4»

производства фирмы "Bio-Rad Laboratories, Inc.", США

МЕТОДИКА ПОВЕРКИ

ПИ РТ 1163 – 2007

Начальник лаб.448  
ФГУ «Ростест-Москва»  
\_\_\_\_\_ В.В.Рыбин  
“ “ \_\_\_\_\_ 2007 г.

Гл. специалист лаб.448  
ФГУ «Ростест-Москва»  
\_\_\_\_\_ А.А.Мягков  
“ “ \_\_\_\_\_ 2007 г.

МОСКВА  
2007 г.



Настоящая методика устанавливает методы и средства первичной и периодической поверки системы для проведения ПЦР в режиме реального времени моделей: «iQ», «iQ5», «Mini Opticon» и «Chromo-4» (далее по тексту - ПЦР-анализатор), изготавливаемых фирмой "Bio-Rad Laboratories, Inc.", США. ПЦР-анализатор предназначен для мультиканального измерения концентрации конечного продукта полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Принцип метода - измерение одновременно с амплификацией в исследуемом образце. Метод основан на измерении флуоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации конечного продукта ПЦР. Измерение концентрации продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляется введением в реакцию флуоресцирующих реактивов, сообщающих об увеличении количества дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) пропорционального увеличению флуоресцентного сигнала.

Межповерочный интервал 1 год.

## 1 ОПЕРАЦИИ И СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

1.1. При проведении поверки должны быть выполнены операции, указанные в таблице 1.

Таблица 1

№ п/п	Наименование операции	№ пункта методики	Эталонные и вспомогательные средства
1.	Внешний осмотр.	5.1.	
2.	Опробование	5.2.	Комплект реагентов для ПЦР-амплификации, например, Хламидия Трахоматис ( <i>Chlamydia trachomatis</i> ) ДНК (формат «Real-time») для амплификатора iCycler iQ. Производства НПФ «ДНК-Технология», Россия.
3.	Определение диапазона измерений концентрации флуоресцеина.	5.3.	-калибровочный раствор флуоресцеина производства фирмы "Bio-Rad Laboratories, Inc.", США, catalog № 170-8780;
4.	Определение среднего квадратического отклонения измерений концентрации флуоресцеина.	5.4.2	-дозатор пипеточный одноканальный переменного объема Pipetman исп. P20 (2 – 20 мкл) номер по Государственному реестру 28123-04;
5.	Проверка линейности при измерении концентрации флуоресцеина	5.4.3.	-дозатор пипеточный одноканальный переменного объема Pipetman исп. P100 (20 – 100 мкл) номер по Государственному реестру 28123-04; -дозатор пипеточный одноканальный переменного объема Pipetman исп. P1000 (200 – 1000 мкл) номер по Государственному реестру 28123-04; -дозатор пипеточный одноканальный переменного объема Pipetman исп. P10 (1,0 – 10,0 мл) номер по Государственному реестру 28123-04; -вода дистиллированная ГОСТ 6709-72; -тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, catalog 223-9473. -пластиковые полипропиленовые или стеклянные пробирки объемом 10 – 15 мл.
6	Оформление результатов поверки	6.1.	

Примечание: 1. Допускается применение иных эталонных средств с метрологическими характеристиками не хуже указанных в таблице 1.



## 2. УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

2.1. Поверка ПЦР-анализатора должна проводиться при следующих внешних условиях:

температура окружающего воздуха, °С	23 ± 5
относительная влажность, %	65 ± 15
напряжение питания, В	220 ± 10%

2.2. В помещении, где производится поверка, не должно быть повышенных уровней электромагнитного излучения, шума и вибрации.

2.3. Не допускается попадание на ПЦР-анализатор прямых солнечных лучей.

2.4. Работы по поверке проводить в ламинарном шкафе 1 класса биологической защиты (биологическая защита рабочей зоны) в стерильных латексных перчатках.

## 3 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

При проведении поверки должны соблюдаться требования безопасности, указанные в Руководстве по эксплуатации (далее по тексту – РЭ), а также правила техники безопасности, принятые на предприятии, эксплуатирующем ПЦР-анализатор.

## 4 ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ

4.1. Подготовить ПЦР-анализатор к работе в соответствии с РЭ.

4.1.1. Включить базовый и оптический модули ПЦР-анализатора.

4.1.2. Включить компьютер и запустить программу «iCycler iQ» или «MJ Mini Opticon» или «Chromo-4». Прогреть систему не менее 30 мин.

4.1.3. Открыть крышку ПЦР-анализатора и установить пустые пробирки для ПЦР в лунки А1, А6, А12, Н1, Н6, Н12 (А1, А3, А6, Н1, Н4, Н6 – для «MJ Mini Opticon») и закрыть крышку.

4.2. Приготовить растворы флуоресцина различной концентрации.

Массовую концентрацию флуоресцина в смесях вычисляют по формуле:

$$C_k = C_i \frac{V_i}{V_i + V_{д.в.}}$$

где  $C_k$  – концентрация флуоресцина в полученной смеси, нмоль/л;

$C_i$  – концентрация флуоресцина, используемая для приготовления данной смеси, нмоль/л;

$V_i$  – объем смеси с концентрацией  $C_i$ , мл;

$V_{д.в.}$  – объем дистиллированной воды, мл

Для этого исходную концентрацию флуоресцеина 1 ммоль/л объемом 10 мкл разводят в пробирке с дистиллированной водой объемом 490 мкл, до концентрации 20 мкмоль/л.

Из полученной концентрации флуоресцеина 20 мкмоль/л готовят второй раствор, с концентрацией 400 нмоль/л. Для этого 200 мкл первого раствора растворяют в пробирке с дистиллированной водой объемом 9,8 мл.

Для получения раствора с концентрацией 200 нмоль/л - 4 мл второго раствора растворяют в пробирке с дистиллированной водой объемом 4 мл.

Для получения раствора с концентрацией 100 нмоль/л - 2 мл второго раствора растворяют в пробирке с дистиллированной водой объемом 6 мл.

Для получения раствора с концентрацией 50 нмоль/л - 1 мл второго раствора растворяют в пробирке с дистиллированной водой объемом 7 мл.



Для получения раствора с концентрацией 25 нмоль/л – 0,5 мл второго раствора растворяют в пробирке с дистиллированной водой объемом 7,5 мл.

Примечание: 1. Приготовленные растворы флюоресцеина хранить в прохладном и светозащищенном месте.

2. Поверку проводить на свежеприготовленных растворах флюоресцеина.

## 5 ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

### 5.1. Внешний осмотр.

При внешнем осмотре должно быть установлено:

- отсутствие механических повреждений корпуса, цифрового дисплея и клавиатуры;
- комплектность ПЦР-анализатора;
- наличие маркировки (тип и заводской номер прибора).

### 5.2. Опробование.

5.2.1. При опробовании должно быть установлено:

- исправность цифрового дисплея и клавиатуры;
- запуск программы и инициализация системы;
- работоспособность термоциклера.

5.2.2. Опробование правильности работы ПЦР-анализатора проводят по контрольным образцам, входящим в комплект реагентов для ПЦР-амплификации. Для этого подготовить ПЦР-анализатор к проведению анализа в соответствии с РЭ. Подготовить комплект реагентов (не менее 2-х пробирок с положительным контрольным образцом и не менее 2-х пробирок без образца), в соответствии, с инструкцией по применению на комплект реагентов для ПЦР-амплификации, например, Хламидия Трахоматис (*Chlamydia trachomattis*). Поставить термический протокол и установить ПЦР-пробирки (с пробами и без) в анализатор. Задать карту планшета и установить тип красителей (FAM и HEX). При необходимости провести калибровку W-фактора. После этого запустить программу анализа.

Результат опробования считается положительным, если во всех пробирках прошел внутренний контроль реагентов для ПЦР-амплификации; в пробирках с положительным контрольным образцом получен положительный результат, а в пробирках без пробы получен отрицательный результат.

5.3. Определение диапазона и погрешности измерения концентрации флуоресцина.

5.3.1. Система для проведения ПЦР в режиме реального времени модели «iQ 5».

5.3.1.1. После запуска программы «iQ 5» войти в раздел «Calibration». При этом окно «Exposure Time» должно быть активным, в противном случае необходимо проверить включение и подсоединение системы. Проверить правильность установки (настройки) маски.

5.3.1.2. Прогреть систему не менее 30 мин. В поле «Warmup Time» должно быть установлено 30 мин.

5.3.1.3. Открыть крышку системы и установить в лунку E6 пробирку для ПЦР с концентрацией флуоресцина 25 нмоль/л. Закрыть крышку. Выбрать время экспозиции



4096 mS, выбрать фильтр поз. 2. Затем активировать кнопку «Show Mask» и нажать «Take an Exposure». Приблизительно через 5 сек на экране отобразится изображение этой лунки. Подвести мышкой курсор к изображению этой лунки и щелкнуть левой кнопкой так, чтобы вокруг ее изображения появилось два квадрата. При этом на изображении лунки не должно быть красных пятен, а в окне «Well» должно быть E06. В строке «Saturated Pixel Count» должно быть 0000,0, если это условие не выполняется, то необходимо уменьшить время экспозиции.

5.3.1.4. Нажать кнопку «Take an Exposure» и после цикла измерения в протокол поверки занести следующие значения:

- «Background fluorescence», RFU;
- «Average Inner fluorescence», RFU;
- «Average Outer fluorescence», RFU;
- «Exposure Time», mS.

Измерения повторить не менее 5 раз.

5.3.1.5. Провести измерения по п.п. 5.3.1.3. и 5.3.1.4. для концентраций флуоресцина 50, 100, 200 и 400 нмоль/л, при этом время экспозиции выбирать равным 2048, 1024, 512 и 256 mS, соответственно.

5.3.1.6. Открыть крышку системы убрать пробирку для ПЦР, закрыть крышку и нажать «Ok». Закрывать программу и выключить систему.

5.3.2. Система для проведения ПЦР в режиме реального времени модели «iQ».

5.3.2.1. После запуска программы «iCycler iQ» активировать кнопку «Run – Timer Central». Нажать «Show Masks» и выбрать лунку E6. Прогреть систему не менее 30 мин.

5.3.2.2. Открыть крышку системы и установить в лунку E6 пробирку для ПЦР с концентрацией флуоресцина 25 нмоль/л. Закрыть крышку. Нажать кнопку «Imaging Services» и выбрать время экспозиции 1280 mS. Нажать кнопку «Home Filteres» и в позиции «Position filters» - «Blank» нажать «Optimize Bias». После этого выбрать фильтр поз. 2 и запустить измерительный цикл, нажав кнопку «Make an Exposure». После каждого переключения экспозиции в позиции «Position filters» - «Blank» нажать «Optimize Bias».

5.3.2.3. После цикла измерения в протокол поверки занести следующие значения:

- «Background fluorescence», RFU;
- «Bias», RFU;
- «Exposure Time», mS.

При этом в разделе «Saturated pixel count» должны быть нулевые показания. если это условие не выполняется, то необходимо уменьшить время экспозиции.

Измерения повторить не менее 5 раз.

5.3.2.4. Провести измерения по п.п. 5.3.2.2. и 5.3.2.3. для концентраций флуоресцина 50, 100, 200 и 400 нмоль/л, при этом время экспозиции выбирать равным 640, 320, 160 и 80 mS, соответственно.

5.3.3. Система для проведения ПЦР в режиме реального времени моделей «Mini Option» и «Chromo 4».

5.3.3.1. После запуска программы «Option Monitor 3» активировать «Plate Setup». Прогреть систему не менее 30 мин.

5.3.3.2. Открыть крышку системы и установить в лунку E6 (D3 – для модели «Mini Option») пробирку для ПЦР с концентрацией флуоресцеина 25 нмоль/л. Закрывать крышку. В разделе «Protocol Setup» нажать «New». Выбрать в Dyes «FAM», выбрать лунку E6 (D3 – для модели «Mini Option») и нажать «Sample». В рамке «Contents» выбрать «S» (Лунка окрашивается в красный цвет) и нажать «Ok». Нажать кнопку «Temperature» и установить 25 °С и время экспозиции 1 S. Нажать кнопку «Insert» и кнопку «Plate Read». После этого нажать кнопку «Go to» и в окне «Go to line» установить 1, а в окне «How Many More Times» установить значение не менее 4. Нажать кнопку «Insert» и кнопку Ok. «New».

5.3.3.3. Нажать активированную кнопку RUN и Save. В полученном протоколе выделить лунку E6 (D3 – для модели «Mini Option»).

Выключить «Subtract Baseline», а движок «Smooth» сдвинуть влево до упора. В панели инструментов выбираем «Quantification Export», выделяем лунку E6 (D3) и снимаем галочки в окне «Data Export Options» и нажимаем «Ok» и сохраняем результат во временном файле. Временный файл открываем с помощью блокнота и регистрируем полученные значения. После этого нажать кнопку «Master» и «Repeat This Run» и на вопрос «Save Changes to Data File» выбрать «No». Дождаться инициализации системы и установить следующий образец.

5.3.3.4. Провести измерения по п.п. 5.3.3.2. и 5.3.3.3. для концентраций флуоресцеина 50, 100, 200 и 400 нмоль/л.

#### 5.4. Обработка результатов измерений концентраций флуоресцеина.

$$I_{срj} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} I_i}{n}$$

5.4.1. Вычислить среднее арифметическое результата измерений:  
где n - число измерений;

5.4.2. Вычислить СКО случайной составляющей погрешности S[Δ] по формуле:

$$S[\Delta] = \frac{1}{I_{срj}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=N} (I_i - I_{срj})^2}{(n-1)}} \cdot 100\%$$

5.4.3. Проверка линейности при измерении концентрации флуоресцеина.

Через полученные значения начальной и конечной концентрации флуоресцеина строят прямую, а по остальных точкам оценивают отклонение от линейности. Для этого определяют коэффициенты уравнения прямой:

$$I_p = \alpha \cdot C_i + \beta, \text{ где}$$

$$\alpha = \frac{I_n - I_1}{C_n - C_1}$$

$$\beta = I_1 - \frac{I_n - I_1}{C_n - C_1} \cdot C_1$$

Где:  $I_n$  – среднее значение показаний системы при измерении максимальной концентрации флуоресцеина (400 нмоль/л);

$I_1$  – среднее значение показаний системы при измерении минимальной концентрации флуоресцеина (25 нмоль/л);



$C_n$  – максимальное значение концентрации флюоресцеина (400 нмоль/л);

$C_1$  - минимальное значение концентрации флюоресцеина (25 нмоль/л).

Относительное отклонение от принятой характеристики:

$$\delta = \frac{I_i - I_{pi}}{I_{pi}} \cdot 100\%$$

5.4.4. Система считается прошедшей поверку, если рассчитанное по формуле значение относительного среднего квадратического отклонения (СКО) случайной составляющей погрешности прибора, при доверительной вероятности  $P=0.95$ , не превышает 5%, а значение относительного отклонения от линейности не превосходит 20%.

## 6. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

6.1. При положительных результатах поверки систем для проведения ПЦР в режиме реального времени моделей: «iQ», «iQ5», «Mini Opticon» и «Chromo-4» на них выдается Свидетельство о поверке установленной формы в соответствии с ПР 50.2.006.

6.2. При отрицательных результатах поверки - системы к дальнейшей эксплуатации не допускаются, а на них выдается извещение о непригодности.