



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-ДНК-ПЛОТОЯДНЫХ-1-ФАКТОР»
для выявления ДНК пушных зверей в кормах методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального
времени**

ТУ 21.10.60-334-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора.....	4
2.1 Принцип действия.....	4
2.2 Состав набора	4
3. Аналитические характеристики	6
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы и оборудование.....	6
6. Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение проб.....	7
7. Проведение анализа	8
7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб	8
7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР	9
7.3 Проведение ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией	9
8. Интерпретация результатов анализа	10
9. Условия транспортирования	11
10. Условия хранения	11
11. Срок годности	12
Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).....	13
Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)..	18
Приложение 3. Порядок работы на приборе LightCycler® 96	20
Приложение 4. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)	27
Приложение 5. Лист вносимых изменений	30

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР РВ	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарно-эпидемиологические правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор предназначен для выявления ДНК пушных зверей семейства куньих, *Mustelidae*, в том числе *Mustela lutreola* европейской норки, *Mustela nivalis* ласки обыкновенной, *Mustela erminea* горностая, *Mustela sibirica* колонка; *Martes zibellina* соболя; американской норки *Neovison vison*, в кормах и кормовых добавках, методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Данный набор служит для исключения фальсификации и контаминации кормов, предназначенных для пушного звероводства, тканями плотоядных семейства куньих (*Mustelidae*).

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

Набор реагентов позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома пушных зверей семейства куньих и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага Т4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления 5' концевой метки.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) Для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы)
- 2) Для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Комплект №1 для проведения ПЦР

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР СМЕСЬ ПЛТ-1	прозрачная бесцветная жидкость*	275	550	1
2	Буфер для проведения ПЦР, ПЦР БУФЕР ПЛТ-1	прозрачная бесцветная жидкость	550	1100	1
3	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	30	60	1
4	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1

Таблица 2. Комплект №2 контрольные образцы

№	Состав комплекта	Описание	Объем,мкл		Кол-во
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО Т1	прозрачная бесцветная жидкость*	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер) ¹	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО ПЛТ-1	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

В набор не входят реактивы для экстракции нуклеиновых кислот. Для выделения ДНК из продуктов животного происхождения, кормов и кормовых добавок рекомендуется использование набора «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» (производитель ООО ВЕТ ФАКТОР).

* Возможна легкая опалесценция

¹ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

3. Аналитические характеристики

Специфичность: показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК животных: домашнего быка *Bos taurus*, овцы *Ovis aries*, козы *Capra hircus*; свиньи *Sus scrofa*, курицы *Gallus gallus*, собаки *Canis lupus*; лошади *Equus caballus*; индейки *Meleagris gallopavo*; а также человека и ДНК растений - сои *Glycine max*, кукурузы *Zea mays*, риса *Oryza sativa*.

Предел обнаружения: в сухих кормах 0,02%.

4. Меры предосторожности

Исследование проводится согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Процесс исследования является строго односторонним, работу следует начинать в зоне подготовки материала, продолжать в зоне экстракции нуклеиновых кислот, затем в зоне амплификации. Запрещается возвращать образцы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, натриевую соль дихлоризоциануровой кислоты, 0,2%).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

5. Материалы и оборудование

Для зоны выделения ДНК из исследуемых проб:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твёрдотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).

- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Tarsons», Индия);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Tarsons», Индия);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК (см. пункт 2.2).

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Rotor-Gene Q», Qiagen; «ДТ-96», ДНК-технология или аналогичный).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2 и 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

6. Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение проб

Отбор исследуемых образцов проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов.

От пробы плотной консистенции отбирают на исследование общую пробу весом 10-50 г. Гранулированную или консервированную продукцию перед исследованием (10-20 г) растирают в ступке до однородного состояния.

Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 мл.

Лабораторные пробы (20 — 40 мг) отбирают на исследование в одноразовые микропробирки вместимостью 1,5 мл в двух повторях. Отобранные лабораторные пробы направляют на выделения ДНК.

Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение 1 мес (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта. Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии при температуре не выше минус 16 °С.

Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-ДНК-ПЛОТОЯДНЫХ-1-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК (на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР», ООО ВЕТ ФАКТОР);
- проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;
- учет результатов анализа.

7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения (ВК-). Внести во все пробирки, включая пробирку ВК-, по 10 мкл ВКО Т1.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения ДНК, в пробирку отрицательного контроля выделения (ВК-) вместо исследуемой пробы внести ОКО² (ТЕ буфер).

Выделять ДНК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК

² Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО ПЛТ-1, ВКО Т1 и ДНК буфера**.

Примечание. Допускается размораживание реагентов из набора перед работой при температуре не выше 40°C (с использованием термостата).

Прогревание пробирки TAQ POLYMERASE категорически запрещено.

В отдельной пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию:

- 5 мкл **ПЦР СМЕСЬ ПЛТ-1;**
- 10 мкл **ПЦР БУФЕР ПЛТ-1;**
- 0,5 мкл **TAQ POLYMERASE**

Перемешать смесь на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл **ДНК буфера;**
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу **ВК-**);
- в) в пробирку положительного контроля ПЦР (К+) 10 мкл **ПКО ПЛТ-1.**

Примечание. При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку (например, ДТ-96), **запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!**

7.3 Проведение ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией

Параметры температурно-временного режима амплификации на приборах «Rotor-Gene Q», «ДТ-96», «LightCycler® 96» и «CFX96» указаны в Приложениях 1, 2, 3 и 4 Инструкции соответственно.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя и в соответствии с Приложениями 1, 2, 3 и 4 Инструкции.

В случае использования амплификаторов других моделей рекомендуется консультация со специалистом компании «ВЕТ ФАКТОР».

После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с МУ 1.3. 2569 -09.

8. Интерпретация результатов анализа

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией производителя к прибору и в соответствии с Приложениями 1, 2, 3 и 4 Инструкции.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа.

Проба	Канал детекции		Результат
	JOE(HEX)/ Yellow	FAM/Green	
	<i>Mustelidae</i>	<i>BKO</i>	
ПКО К+	До 31	до 31	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
ДНК буфер К-	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Реакция прошла успешно
	Любое значение	Сигнал отсутствует или любое значение	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	Сигнал отсутствует	Любое значение	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО ВК-	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 35	Экстракция прошла успешно
	Любое значение	Сигнал отсутствует или любое значение	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >35	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

Проба	Канал детекции		Результат
	JOE(HEX)/ Yellow	FAM/Green	
	<i>Mustelidae</i>	<i>ВКО</i>	
Образцы	Любое значение от 1 до 37	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный . ДНК куньих (<i>Mustelidae</i>) обнаружена
	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 35	Результат анализа отрицательный
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >35	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

В случае, если в ВК- значение Ct для ВКО отсутствует или превышает граничное, а в К+ значение Ct для ВКО менее граничного (и в образцах Ct для ВКО менее граничного) – результаты можно считать достоверными. Также в случае если значение Ct для ВКО в К+ отсутствует или превышает граничное, а в ВК- и образцах менее граничного – результаты можно считать достоверными.

Если для исследуемого образца по каналу **JOE(HEX)/Yellow** значение **Ct** определяется позднее **37** цикла при корректном прохождении положительных и отрицательных контролей, образец исследуется повторно с этапа экстракция ДНК. Если при повторной постановке **Ct > 37** результат считается отрицательным (содержание целевой ДНК ниже предела обнаружения метода).

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения Ct для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения Ct на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации.

9. Условия транспортирования

Набор «ПЦР-ДНК-ПЛОТЯДНЫХ-1-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10. Условия хранения

Длительное хранение комплектов набора «ПЦР-ДНК-ПЛОТЯДНЫХ-1-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

Перед началом работы с набором компоненты набора следует разукomплектовать и хранить в соответствии со следующими требованиями:

Комплект №1 (см. Табл. 1) при температуре от минус 18 до минус 20°С;

Комплект №2 (см. Табл. 2) при температуре от 2 до 8°С.

11. Срок годности

Срок годности реагентов «ПЦР-ДНК-ПЛОТЯДНЫХ-1-ФАКТОР»
12 месяцев.

Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

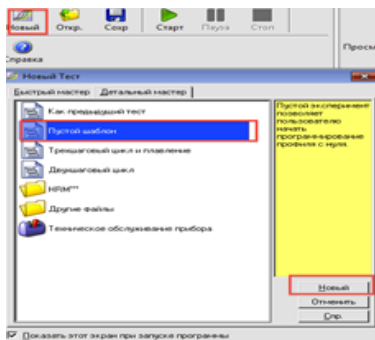
Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ПЛТ-1-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

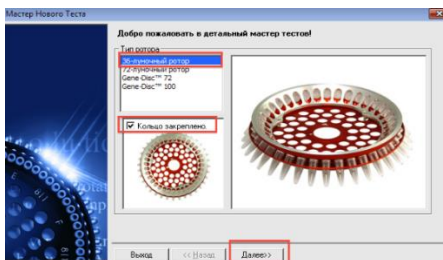
При работе с прибором Rotor-Gene 3000 используют программу Rotor-Gene версии 6 или выше, с приборами Rotor-Gene6000и Rotor-GeneQ– используют программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build67) или выше.

Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «**Rotor-Gene**» **3000** / для англоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» **6000 (Q)**/ для русскоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» **6000 (Q)**.

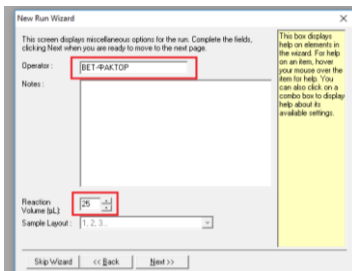
1. Открыть программу «**Rotor Gene Q**».
2. Выбрать в основном меню программы значок «**New**»/«**Новый** В открывшемся окне выбрать «**Пустой шаблон**», нажать кнопку «**New**»/«**Новый**».



3. Выбрать тип ротора. Например, «**36-Well Rotor**»/«**36-луночный ротор**» при использовании ротора на 36 образцов. Поставить отметку в окошке рядом с надписью «**No Domed 0.2 ml Tubes**»/«**Locking ring attached**»/«**Кольцо закреплено**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».



4. Указать оператора, объем реакционной смеси **«Reaction volume»/«Объем реакции» – 25 мкл.** Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **«15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска».** Нажать кнопку **«Next»/«Далее».**



5. В верхней части окна нажать кнопку **«Edit profile»/«Редактор профиля».** В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 4. Нажать клавишу **«ОК».**

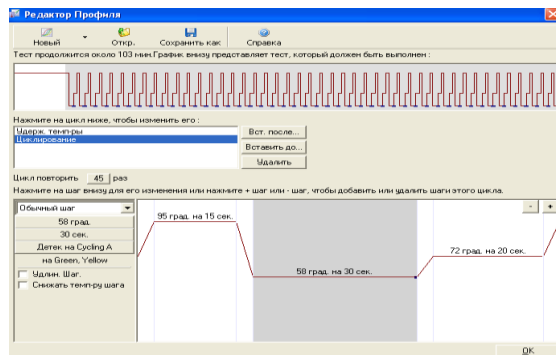
Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации на Rotor-Gene

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95° C – 5 мин	1
2	95°С – 15 сек	40
	60°С – 30 сек, детекция FAM/Green, JOE/Yellow	
	72°С – 20 сек	

Для этого требуется проделать следующие шаги:

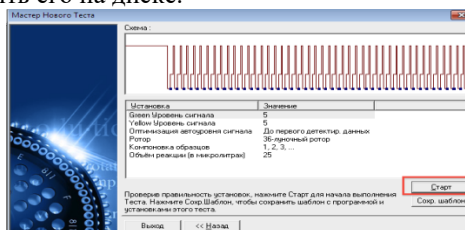
-Нажать клавишу **«Insert before»/«Вставить до»** и выбрать **«New hold at temperature»/«Новое удержание температуры»**, установить температуру 95°С и время 5 мин в соответствии с пунктом 1 таблицы 4;

-Нажать клавишу **«Insert after»/«Вставить после»** и выбрать **«New cycling»/«Новое циклирование»**, установить параметры циклирования в соответствии с пунктом 2 таблицы 4.

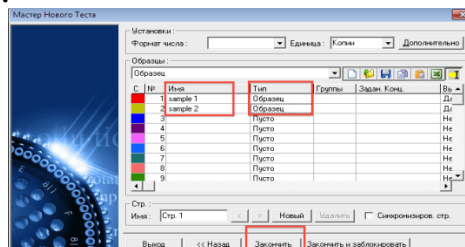


6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку «**Calibrate/Gain Optimisation...**»/«**Опт.уровня сигн.**». В открывшемся окне нажать кнопку «**Опт.детек-мых**». Для обоих каналов указать нужный диапазон стартового сигнала: **Min Reading** /минимальный сигнал - 5, **Max Reading** /максимальный сигнал — 10. В графе «**Позиция Пробирки**» указать номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «**усиления сигнала**», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поставить галочкой строку **Perform Calibration Before 1st Acquisition** «**Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**». Закрыть окно «Авто-оптимизация уровня сигнала». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».

7. Запустить амплификацию кнопкой «**Start run**»/«**Старт**». Дать название эксперименту и сохранить его на диске.



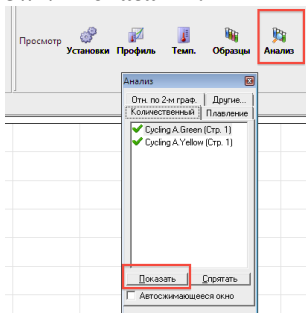
8. После запуска программы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Все пробы и контроли обозначить в меню Тип как «**Unknown**»/«**Образец**».



9. После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.

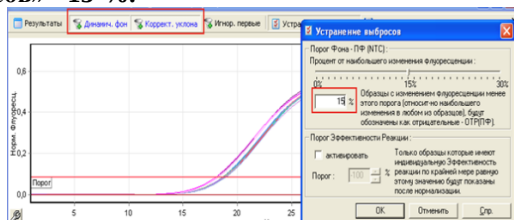
Анализ результатов амплификации для канала FAM/ Green.

10. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», далее «Show»/«Показать».



11. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale**/Линейная шкала в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale**/Линейная шкала видна кнопка **Log scale**/Логарифмическая шкала).

12. В меню основного окна нажать кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и Slope Correct/«Коррект. уклона». Установить More settings/Outlier Removal «Устранение выбросов» - 15³%.



13 В меню «CT Calculation»/«Вычисление СТ» выставить **Threshold/Порог =0.05**. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

³ Если для отрицательного контроля этапа ПЦР K- на канале FAM/ Green при учете результатов по п 8 Инструкции наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, измените «Устранение выбросов» до 20% и оцените прохождение контрольных образцов повторно.

Количественные Результаты - Cycling A.Green (...)					
№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Р-ра (>)
1	k+	Образец	17,07		
2	k-	Образец			
3	sample 1	Образец	19,88		
4	sample 2	Образец	19,33		

Анализ результатов амплификации для канала JOE/Yellow.

14. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow**, далее нажать **Show/Показать**.

15. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Логарифмическая шкала**).

16. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки **«Dynamic tube»/«Динамич.фон»** и **Slope Correct/Коррект. уклона**. Установить **More settings/Outlier Removal «Устранение выбросов»** - 15⁴ %.

17. В меню **«СТ Calculation»/«Вычисление СТ»** выставить **Threshold/Порог** =0,05. В таблице результатов (окно **«Quant. Results»/«Количественные Результаты»**) появятся значения Ст.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

⁴ Если для отрицательных контролей этапов экстракции или ПЦР (ВК-, К-) на канале JOE(HEX)/Yellow при учете результатов по п 8 Инструкции наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, измените **«Устранение выбросов»** до 20% и оцените прохождение контрольных образцов повторно.

Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «**ПЦР-ПЛТ-1-ФАКТОР**» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

1. Открыть программу «**RealTime PCR**» для прибора ДТ-96.
2. В появившемся окне выбрать «**Работа с прибором**».
3. В верхней части окна открыть вкладку «**Тест**» и «**Создать/Редактировать тест**»:
4. Нажать на кнопку «**Создать новый тест**» и ввести имя нового теста «**ПЦР-ПЛТ-1-ФАКТОР**».

Нажать «**ОК**».

5. В появившемся окне задать следующие параметры:

Тип – качественный

Метод – Пороговый (Ct)

Пробирки – образцы

Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл

Флуорофоры – Fam; Hex

Создать программу амплификации «**ПЦР-ПЛТ-1-ФАКТОР**» нажав на иконку .

6. В редакторе программ амплификации выбрать шаблон  и нажать кнопку «**Применить**».

7. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 5.

Таблица 5. Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95° С – 5 мин	1
2	95°С – 10 сек	40
	60°С – 30 сек, детекция FAM, HEX	
	72°С – 20 сек	

Детекцию осуществлять после стадии отжиг. Нажать «**ОК**» и сохранить программу под именем «**ПЦР-ПЛТ-1-ФАКТОР**». При дальнейшей работе использовать созданную программу.

8. При запуске прибора выбрать «**Работа с прибором**» и «**Добавить тест**». В окне добавления теста выбрать «**ПЦР-ПЛТ-1-ФАКТОР**».

9. В разделе «**1. Образцы**» ввести количество образцов включая все контрольные образцы. В разделе «**3. Контроли**» поставить нули и нажать «**ОК**».

10. Пользуясь инструкцией к прибору заполнить «**Идентификатор пробирки**» и «**Тип**», обращая внимание на порядок заполнения. Нажать кнопку «**Применить**».

11. Установить пробирки в реакционный блок согласно порядку заполнения и нажать кнопку «**Запуск программы**». В появившемся окне набрать название протокола и «**Сохранить**».

12. После завершения реакции можно сразу приступить к анализу результатов, либо при следующей загрузке нажать «**Просмотр архива**».

13. Далее нажать на иконку с изображением папки  и выбрать файл, в котором был сохранен протокол. Выбрать тип анализа «**St(Cp) для всех каналов**». Метод – «**Пороговый (St)**». В окне справа отобразятся названия образцов и значения пороговых циклов. Выбрать 10%. В позиции **Критерии достоверности данных** ввести: Нижняя граница/порог положительного результата-5%, верхняя граница/порог нормализации данных -30%.

14. Нажать кнопку «**Применить**».

15. Для получения сводного отчета по протоколу необходимо нажать кнопку  .

16. В верхней части окна нажать клавишу «**Печать**» или «**Сохранить**», выбрать расширение файла, например *.rtf MS Word, далее «**Рабочий стол**» → «**ПЦР-ПЛТ-1-ФАКТОР**» → «**Отчеты**» → «**Год**» → «**Месяц**», в поле «**Имя файла**» ввести название в форме «**год. месяц. число-данные**». Нажать сохранить.

17. Нажать клавишу «**Заккрыть**». Заккрыть или свернуть программу «**RealTime PCR**».

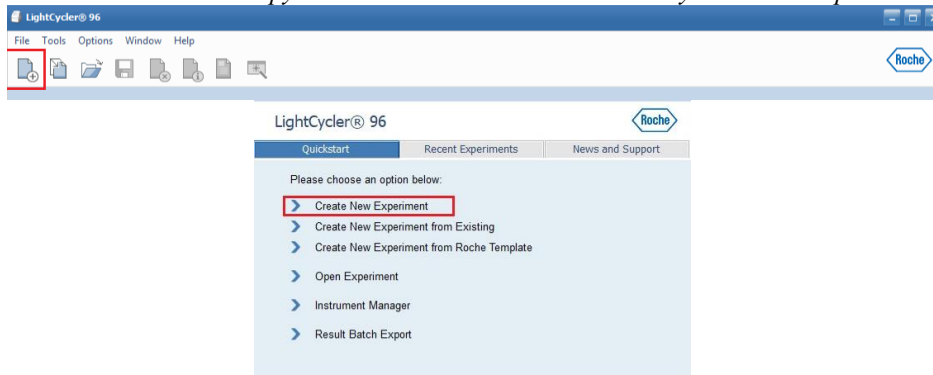
Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «St» для исследуемого образца.

Приложение 3. Порядок работы на приборе LightCycler® 96

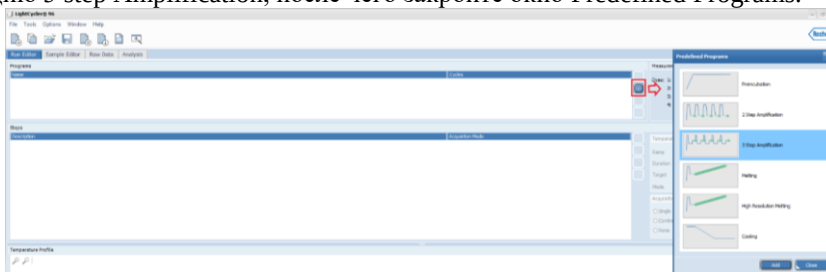
Перед началом работы включите прибор *LightCycler® 96* с помощью переключателя на задней панели прибора. Далее прибор проведет автоматическое тестирование (см. инструкцию к прибору), следует дождаться его окончания.

1. Откройте рабочую программу *LightCycler® 96*, для чего дважды кликните по значку запуска программы. Дождитесь загрузки меню и открытия основного окна после инициализации.

2. Выберите пункт *Create new Experiment (создать новый эксперимент)* либо в панели меню инструментов кликните по значку *New Experiment*.



3. В открывшемся окне выберите вкладку *Run Editor*, в боковой части окна *Programs* нажмите , после чего откроется окно *Predefined Programs*. В данном окне выберите *Preincubation*, нажмите кнопку *Add*, после чего в левой части экрана *Programs* появится стадия *Preincubation*. Аналогичным образом добавьте стадию *3 step Amplification*, после чего закройте окно *Predefined Programs*.

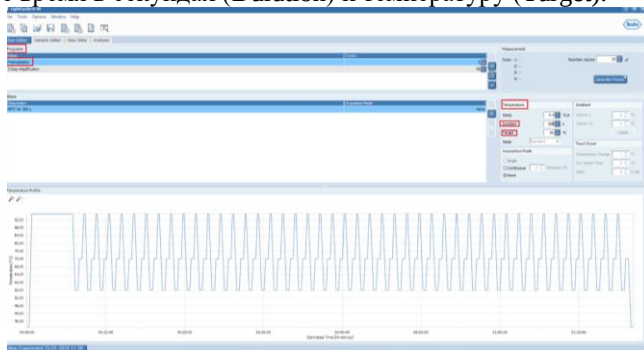


Задайте параметры амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 6.

Таблица 6. Температурно-временной режим амплификации на LightCycler® 96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95° C – 300 сек	1
2	95°С – 10 сек	40
	60°С – 30 сек, детекция FAM, HEX	
	72°С – 20 сек	

Для этого в левой верхней части окна в разделе Programs выберете Preincubation, далее в нижней правой части, в разделе Temperature задайте необходимое время в секундах (Duration) и температуру (Target).



Далее в левой верхней части окна в разделе Programs выберете 3 step Amplification и для каждого шага детекции аналогичным образом задайте необходимые время и температуру. Шаги детекции переключаются в левой нижней части окна в разделе Steps. В разделе Acquisition Mode на нужной стадии необходимо указать считывание сигнала (single).



В столбце Cycles с помощью стрелок вверх и вниз задайте необходимое число циклов для каждого этапа.

В окне Reaction Volume, в разделе Measurement (в правой части окна) укажите объем реакции равный 25 мкл.

Под Reaction Volume нажмите вкладку

Detection Format

и отметьте флуорофоры Fam и Hex

Detection Format

Channel 1, 470/514

Selected	Dye	Quant Factor	Melt Factor
☐	SYBR Green I	20.00	1.20
☐	Resolight	20.00	1.20
☒	FAM	10.00	1.20

Channel 2, 533/572

Selected	Dye	Quant Factor	Melt Factor
☐	VIC	10.00	1.20
☒	Hex	10.00	1.20
☐	Yellow555	10.00	1.20

Channel 3, 577/620

Selected	Dye	Quant Factor	Melt Factor
☐	Radii 10	10.00	1.20
☐	Texas Red	10.00	1.20

Channel 4, 645/697

Selected	Dye	Quant Factor	Melt Factor
☐	Cy5	10.00	1.20

Integration Time

☒ Dynamic ☐ Manual

OK Cancel

4. Перейдите на вкладку Sample Editor⁵ (правка образцов). Пустые лунки следует удалить, оставив только значимые данные, для чего выделите пустые ячейки с помощью левой кнопки мыши и нажмите кнопку в правой нижней части раздела Clear wells:

Sample Editor

File Tools Options Window Help

Run Editor Sample Editor New Data Analyze

Table Editor Table View

Table Editor

Well A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12

Well B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12

Well C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12

Well D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10 D11 D12

Well E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12

Well F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12

Well G1 G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11 G12

Well H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12

Well I1 I2 I3 I4 I5 I6 I7 I8 I9 I10 I11 I12

Well J1 J2 J3 J4 J5 J6 J7 J8 J9 J10 J11 J12

Well K1 K2 K3 K4 K5 K6 K7 K8 K9 K10 K11 K12

Well L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L10 L11 L12

Well M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 M8 M9 M10 M11 M12

Well N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9 N10 N11 N12

Well O1 O2 O3 O4 O5 O6 O7 O8 O9 O10 O11 O12

Well P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9 P10 P11 P12

Well Q1 Q2 Q3 Q4 Q5 Q6 Q7 Q8 Q9 Q10 Q11 Q12

Well R1 R2 R3 R4 R5 R6 R7 R8 R9 R10 R11 R12

Well S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 S11 S12

Well T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8 T9 T10 T11 T12

Well U1 U2 U3 U4 U5 U6 U7 U8 U9 U10 U11 U12

Well V1 V2 V3 V4 V5 V6 V7 V8 V9 V10 V11 V12

Well W1 W2 W3 W4 W5 W6 W7 W8 W9 W10 W11 W12

Well X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9 X10 X11 X12

Well Y1 Y2 Y3 Y4 Y5 Y6 Y7 Y8 Y9 Y10 Y11 Y12

Well Z1 Z2 Z3 Z4 Z5 Z6 Z7 Z8 Z9 Z10 Z11 Z12

Well AA1 AA2 AA3 AA4 AA5 AA6 AA7 AA8 AA9 AA10 AA11 AA12

Well AB1 AB2 AB3 AB4 AB5 AB6 AB7 AB8 AB9 AB10 AB11 AB12

Well AC1 AC2 AC3 AC4 AC5 AC6 AC7 AC8 AC9 AC10 AC11 AC12

Well AD1 AD2 AD3 AD4 AD5 AD6 AD7 AD8 AD9 AD10 AD11 AD12

Well AE1 AE2 AE3 AE4 AE5 AE6 AE7 AE8 AE9 AE10 AE11 AE12

Well AF1 AF2 AF3 AF4 AF5 AF6 AF7 AF8 AF9 AF10 AF11 AF12

Well AG1 AG2 AG3 AG4 AG5 AG6 AG7 AG8 AG9 AG10 AG11 AG12

Well AH1 AH2 AH3 AH4 AH5 AH6 AH7 AH8 AH9 AH10 AH11 AH12

Well AI1 AI2 AI3 AI4 AI5 AI6 AI7 AI8 AI9 AI10 AI11 AI12

Well AJ1 AJ2 AJ3 AJ4 AJ5 AJ6 AJ7 AJ8 AJ9 AJ10 AJ11 AJ12

Well AK1 AK2 AK3 AK4 AK5 AK6 AK7 AK8 AK9 AK10 AK11 AK12

Well AL1 AL2 AL3 AL4 AL5 AL6 AL7 AL8 AL9 AL10 AL11 AL12

Well AM1 AM2 AM3 AM4 AM5 AM6 AM7 AM8 AM9 AM10 AM11 AM12

Well AN1 AN2 AN3 AN4 AN5 AN6 AN7 AN8 AN9 AN10 AN11 AN12

Well AO1 AO2 AO3 AO4 AO5 AO6 AO7 AO8 AO9 AO10 AO11 AO12

Well AP1 AP2 AP3 AP4 AP5 AP6 AP7 AP8 AP9 AP10 AP11 AP12

Well AQ1 AQ2 AQ3 AQ4 AQ5 AQ6 AQ7 AQ8 AQ9 AQ10 AQ11 AQ12

Well AR1 AR2 AR3 AR4 AR5 AR6 AR7 AR8 AR9 AR10 AR11 AR12

Well AS1 AS2 AS3 AS4 AS5 AS6 AS7 AS8 AS9 AS10 AS11 AS12

Well AT1 AT2 AT3 AT4 AT5 AT6 AT7 AT8 AT9 AT10 AT11 AT12

Well AU1 AU2 AU3 AU4 AU5 AU6 AU7 AU8 AU9 AU10 AU11 AU12

Well AV1 AV2 AV3 AV4 AV5 AV6 AV7 AV8 AV9 AV10 AV11 AV12

Well AW1 AW2 AW3 AW4 AW5 AW6 AW7 AW8 AW9 AW10 AW11 AW12

Well AX1 AX2 AX3 AX4 AX5 AX6 AX7 AX8 AX9 AX10 AX11 AX12

Well AY1 AY2 AY3 AY4 AY5 AY6 AY7 AY8 AY9 AY10 AY11 AY12

Well AZ1 AZ2 AZ3 AZ4 AZ5 AZ6 AZ7 AZ8 AZ9 AZ10 AZ11 AZ12

Well BA1 BA2 BA3 BA4 BA5 BA6 BA7 BA8 BA9 BA10 BA11 BA12

Well BB1 BB2 BB3 BB4 BB5 BB6 BB7 BB8 BB9 BB10 BB11 BB12

Well BC1 BC2 BC3 BC4 BC5 BC6 BC7 BC8 BC9 BC10 BC11 BC12

Well BD1 BD2 BD3 BD4 BD5 BD6 BD7 BD8 BD9 BD10 BD11 BD12

Well BE1 BE2 BE3 BE4 BE5 BE6 BE7 BE8 BE9 BE10 BE11 BE12

Well BF1 BF2 BF3 BF4 BF5 BF6 BF7 BF8 BF9 BF10 BF11 BF12

Well BG1 BG2 BG3 BG4 BG5 BG6 BG7 BG8 BG9 BG10 BG11 BG12

Well BH1 BH2 BH3 BH4 BH5 BH6 BH7 BH8 BH9 BH10 BH11 BH12

Well BI1 BI2 BI3 BI4 BI5 BI6 BI7 BI8 BI9 BI10 BI11 BI12

Well BJ1 BJ2 BJ3 BJ4 BJ5 BJ6 BJ7 BJ8 BJ9 BJ10 BJ11 BJ12

Well BK1 BK2 BK3 BK4 BK5 BK6 BK7 BK8 BK9 BK10 BK11 BK12

Well BL1 BL2 BL3 BL4 BL5 BL6 BL7 BL8 BL9 BL10 BL11 BL12

Well BM1 BM2 BM3 BM4 BM5 BM6 BM7 BM8 BM9 BM10 BM11 BM12

Well BN1 BN2 BN3 BN4 BN5 BN6 BN7 BN8 BN9 BN10 BN11 BN12

Well BO1 BO2 BO3 BO4 BO5 BO6 BO7 BO8 BO9 BO10 BO11 BO12

Well BP1 BP2 BP3 BP4 BP5 BP6 BP7 BP8 BP9 BP10 BP11 BP12

Well BQ1 BQ2 BQ3 BQ4 BQ5 BQ6 BQ7 BQ8 BQ9 BQ10 BQ11 BQ12

Well BR1 BR2 BR3 BR4 BR5 BR6 BR7 BR8 BR9 BR10 BR11 BR12

Well BS1 BS2 BS3 BS4 BS5 BS6 BS7 BS8 BS9 BS10 BS11 BS12

Well BT1 BT2 BT3 BT4 BT5 BT6 BT7 BT8 BT9 BT10 BT11 BT12

Well BU1 BU2 BU3 BU4 BU5 BU6 BU7 BU8 BU9 BU10 BU11 BU12

Well BV1 BV2 BV3 BV4 BV5 BV6 BV7 BV8 BV9 BV10 BV11 BV12

Well BW1 BW2 BW3 BW4 BW5 BW6 BW7 BW8 BW9 BW10 BW11 BW12

Well BX1 BX2 BX3 BX4 BX5 BX6 BX7 BX8 BX9 BX10 BX11 BX12

Well BY1 BY2 BY3 BY4 BY5 BY6 BY7 BY8 BY9 BY10 BY11 BY12

Well BZ1 BZ2 BZ3 BZ4 BZ5 BZ6 BZ7 BZ8 BZ9 BZ10 BZ11 BZ12

Well CA1 CA2 CA3 CA4 CA5 CA6 CA7 CA8 CA9 CA10 CA11 CA12

Well CB1 CB2 CB3 CB4 CB5 CB6 CB7 CB8 CB9 CB10 CB11 CB12

Well CC1 CC2 CC3 CC4 CC5 CC6 CC7 CC8 CC9 CC10 CC11 CC12

Well CD1 CD2 CD3 CD4 CD5 CD6 CD7 CD8 CD9 CD10 CD11 CD12

Well CE1 CE2 CE3 CE4 CE5 CE6 CE7 CE8 CE9 CE10 CE11 CE12

Well CF1 CF2 CF3 CF4 CF5 CF6 CF7 CF8 CF9 CF10 CF11 CF12

Well CG1 CG2 CG3 CG4 CG5 CG6 CG7 CG8 CG9 CG10 CG11 CG12

Well CH1 CH2 CH3 CH4 CH5 CH6 CH7 CH8 CH9 CH10 CH11 CH12

Well CI1 CI2 CI3 CI4 CI5 CI6 CI7 CI8 CI9 CI10 CI11 CI12

Well CJ1 CJ2 CJ3 CJ4 CJ5 CJ6 CJ7 CJ8 CJ9 CJ10 CJ11 CJ12

Well CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7 CK8 CK9 CK10 CK11 CK12

Well CL1 CL2 CL3 CL4 CL5 CL6 CL7 CL8 CL9 CL10 CL11 CL12

Well CM1 CM2 CM3 CM4 CM5 CM6 CM7 CM8 CM9 CM10 CM11 CM12

Well CN1 CN2 CN3 CN4 CN5 CN6 CN7 CN8 CN9 CN10 CN11 CN12

Well CO1 CO2 CO3 CO4 CO5 CO6 CO7 CO8 CO9 CO10 CO11 CO12

Well CP1 CP2 CP3 CP4 CP5 CP6 CP7 CP8 CP9 CP10 CP11 CP12

Well CQ1 CQ2 CQ3 CQ4 CQ5 CQ6 CQ7 CQ8 CQ9 CQ10 CQ11 CQ12

Well CR1 CR2 CR3 CR4 CR5 CR6 CR7 CR8 CR9 CR10 CR11 CR12

Well CS1 CS2 CS3 CS4 CS5 CS6 CS7 CS8 CS9 CS10 CS11 CS12

Well CT1 CT2 CT3 CT4 CT5 CT6 CT7 CT8 CT9 CT10 CT11 CT12

Well CU1 CU2 CU3 CU4 CU5 CU6 CU7 CU8 CU9 CU10 CU11 CU12

Well CV1 CV2 CV3 CV4 CV5 CV6 CV7 CV8 CV9 CV10 CV11 CV12

Well CW1 CW2 CW3 CW4 CW5 CW6 CW7 CW8 CW9 CW10 CW11 CW12

Well CX1 CX2 CX3 CX4 CX5 CX6 CX7 CX8 CX9 CX10 CX11 CX12

Well CY1 CY2 CY3 CY4 CY5 CY6 CY7 CY8 CY9 CY10 CY11 CY12

Well CZ1 CZ2 CZ3 CZ4 CZ5 CZ6 CZ7 CZ8 CZ9 CZ10 CZ11 CZ12

Well DA1 DA2 DA3 DA4 DA5 DA6 DA7 DA8 DA9 DA10 DA11 DA12

Well DB1 DB2 DB3 DB4 DB5 DB6 DB7 DB8 DB9 DB10 DB11 DB12

Well DC1 DC2 DC3 DC4 DC5 DC6 DC7 DC8 DC9 DC10 DC11 DC12

Well DD1 DD2 DD3 DD4 DD5 DD6 DD7 DD8 DD9 DD10 DD11 DD12

Well DE1 DE2 DE3 DE4 DE5 DE6 DE7 DE8 DE9 DE10 DE11 DE12

Well DF1 DF2 DF3 DF4 DF5 DF6 DF7 DF8 DF9 DF10 DF11 DF12

Well DG1 DG2 DG3 DG4 DG5 DG6 DG7 DG8 DG9 DG10 DG11 DG12

Well DH1 DH2 DH3 DH4 DH5 DH6 DH7 DH8 DH9 DH10 DH11 DH12

Well DI1 DI2 DI3 DI4 DI5 DI6 DI7 DI8 DI9 DI10 DI11 DI12

Well DJ1 DJ2 DJ3 DJ4 DJ5 DJ6 DJ7 DJ8 DJ9 DJ10 DJ11 DJ12

Well DK1 DK2 DK3 DK4 DK5 DK6 DK7 DK8 DK9 DK10 DK11 DK12

Well DL1 DL2 DL3 DL4 DL5 DL6 DL7 DL8 DL9 DL10 DL11 DL12

Well DM1 DM2 DM3 DM4 DM5 DM6 DM7 DM8 DM9 DM10 DM11 DM12

Well DN1 DN2 DN3 DN4 DN5 DN6 DN7 DN8 DN9 DN10 DN11 DN12

Well DO1 DO2 DO3 DO4 DO5 DO6 DO7 DO8 DO9 DO10 DO11 DO12

Well DP1 DP2 DP3 DP4 DP5 DP6 DP7 DP8 DP9 DP10 DP11 DP12

Well DQ1 DQ2 DQ3 DQ4 DQ5 DQ6 DQ7 DQ8 DQ9 DQ10 DQ11 DQ12

Well DR1 DR2 DR3 DR4 DR5 DR6 DR7 DR8 DR9 DR10 DR11 DR12

Well DS1 DS2 DS3 DS4 DS5 DS6 DS7 DS8 DS9 DS10 DS11 DS12

Well DT1 DT2 DT3 DT4 DT5 DT6 DT7 DT8 DT9 DT10 DT11 DT12

Well DU1 DU2 DU3 DU4 DU5 DU6 DU7 DU8 DU9 DU10 DU11 DU12

Well DV1 DV2 DV3 DV4 DV5 DV6 DV7 DV8 DV9 DV10 DV11 DV12

Well DW1 DW2 DW3 DW4 DW5 DW6 DW7 DW8 DW9 DW10 DW11 DW12

Well DX1 DX2 DX3 DX4 DX5 DX6 DX7 DX8 DX9 DX10 DX11 DX12

Well DY1 DY2 DY3 DY4 DY5 DY6 DY7 DY8 DY9 DY10 DY11 DY12

Well DZ1 DZ2 DZ3 DZ4 DZ5 DZ6 DZ7 DZ8 DZ9 DZ10 DZ11 DZ12

Well EA1 EA2 EA3 EA4 EA5 EA6 EA7 EA8 EA9 EA10 EA11 EA12

Well EB1 EB2 EB3 EB4 EB5 EB6 EB7 EB8 EB9 EB10 EB11 EB12

Well EC1 EC2 EC3 EC4 EC5 EC6 EC7 EC8 EC9 EC10 EC11 EC12

Well ED1 ED2 ED3 ED4 ED5 ED6 ED7 ED8 ED9 ED10 ED11 ED12

Well EE1 EE2 EE3 EE4 EE5 EE6 EE7 EE8 EE9 EE10 EE11 EE12

Well EF1 EF2 EF3 EF4 EF5 EF6 EF7 EF8 EF9 EF10 EF11 EF12

Well EG1 EG2 EG3 EG4 EG5 EG6 EG7 EG8 EG9 EG10 EG11 EG12

Well EH1 EH2 EH3 EH4 EH5 EH6 EH7 EH8 EH9 EH10 EH11 EH12

Well EI1 EI2 EI3 EI4 EI5 EI6 EI7 EI8 EI9 EI10 EI11 EI12

Well EJ1 EJ2 EJ3 EJ4 EJ5 EJ6 EJ7 EJ8 EJ9 EJ10 EJ11 EJ12

Well EK1 EK2 EK3 EK4 EK5 EK6 EK7 EK8 EK9 EK10 EK11 EK12

Well EL1 EL2 EL3 EL4 EL5 EL6 EL7 EL8 EL9 EL10 EL11 EL12

Well EM1 EM2 EM3 EM4 EM5 EM6 EM7 EM8 EM9 EM10 EM11 EM12

Well EN1 EN2 EN3 EN4 EN5 EN6 EN7 EN8 EN9 EN10 EN11 EN12

Well EO1 EO2 EO3 EO4 EO5 EO6 EO7 EO8 EO9 EO10 EO11 EO12

Well EP1 EP2 EP3 EP4 EP5 EP6 EP7 EP8 EP9 EP10 EP11 EP12

Well EQ1 EQ2 EQ3 EQ4 EQ5 EQ6 EQ7 EQ8 EQ9 EQ10 EQ11 EQ12

Well ER1 ER2 ER3 ER4 ER5 ER6 ER7 ER8 ER9 ER10 ER11 ER12

Well ES1 ES2 ES3 ES4 ES5 ES6 ES7 ES8 ES9 ES10 ES11 ES12

Well ET1 ET2 ET3 ET4 ET5 ET6 ET7 ET8 ET9 ET10 ET11 ET12

Well EU1 EU2 EU3 EU4 EU5 EU6 EU7 EU8 EU9 EU10 EU11 EU12

Well EV1 EV2 EV3 EV4 EV5 EV6 EV7 EV8 EV9 EV10 EV11 EV12

Well EW1 EW2 EW3 EW4 EW5 EW6 EW7 EW8 EW9 EW10 EW11 EW12

Well EX1 EX2 EX3 EX4 EX5 EX6 EX7 EX8 EX9 EX10 EX11 EX12

Well EY1 EY2 EY3 EY4 EY5 EY6 EY7 EY8 EY9 EY10 EY11 EY12

Well EZ1 EZ2 EZ3 EZ4 EZ5 EZ6 EZ7 EZ8 EZ9 EZ10 EZ11 EZ12

Well FA1 FA2 FA3 FA4 FA5 FA6 FA7 FA8 FA9 FA10 FA11 FA12

Well FB1 FB2 FB3 FB4 FB5 FB6 FB7 FB8 FB9 FB10 FB11 FB12

Well FC1 FC2 FC3 FC4 FC5 FC6 FC7 FC8 FC9 FC10 FC11 FC12

Well FD1 FD2 FD3 FD4 FD5 FD6 FD7 FD8 FD9 FD10 FD11 FD12

Well FE1 FE2 FE3 FE4 FE5 FE6 FE7 FE8 FE9 FE10 FE11 FE12

Well FF1 FF2 FF3 FF4 FF5 FF6 FF7 FF8 FF9 FF10 FF11 FF12

Well FG1 FG2 FG3 FG4 FG5 FG6 FG7 FG8 FG9 FG10 FG11 FG12

Well FH1 FH2 FH3 FH4 FH5 FH6 FH7 FH8 FH9 FH10 FH11 FH12

Well FI1 FI2 FI3 FI4 FI5 FI6 FI7 FI8 FI9 FI10 FI11 FI12

Well FJ1 FJ2 FJ3 FJ4 FJ5 FJ6 FJ7 FJ8 FJ9 FJ10 FJ11 FJ12

Well FK1 FK2 FK3 FK4 FK5 FK6 FK7 FK8 FK9 FK10 FK11 FK12

Well FL1 FL2 FL3 FL4 FL5 FL6 FL7 FL8 FL9 FL10 FL11 FL12

Well FM1 FM2 FM3 FM4 FM5 FM6 FM7 FM8 FM9 FM10 FM11 FM12

Well FN1 FN2 FN3 FN4 FN5 FN6 FN7 FN8 FN9 FN10 FN11 FN12

Well FO1 FO2 FO3 FO4 FO5 FO6 FO7 FO8 FO9 FO10 FO11 FO12

Well FP1 FP2 FP3 FP4 FP5 FP6 FP7 FP8 FP9 FP10 FP11 FP12

Well FQ1 FQ2 FQ3 FQ4 FQ5 FQ6 FQ7 FQ8 FQ9 FQ10 FQ11 FQ12

Well FR1 FR2 FR3 FR4 FR5 FR6 FR7 FR8 FR9 FR10 FR11 FR12

Well FS1 FS2 FS3 FS4 FS5 FS6 FS7 FS8 FS9 FS10 FS11 FS12

Well FT1 FT2 FT3 FT4 FT5 FT6 FT7 FT8 FT9 FT10 FT11 FT12

Well FU1 FU2 FU3 FU4 FU5 FU6 FU7 FU8 FU9 FU10 FU11 FU12

Well FV1 FV2 FV3 FV4 FV5 FV6 FV7 FV8 FV9 FV10 FV11 FV12

Well FW1 FW2 FW3 FW4 FW5 FW6 FW7 FW8 FW9 FW10 FW11 FW12

Well FX1 FX2 FX3 FX4 FX5 FX6 FX7 FX8 FX9 FX10 FX11 FX12

Well FY1 FY2 FY3 FY4 FY5 FY6 FY7 FY8 FY9 FY10 FY11 FY12

Well FZ1 FZ2 FZ3 FZ4 FZ5 FZ6 FZ7 FZ8 FZ9 FZ10 FZ11 FZ12

Well GA1 GA2 GA3 GA4 GA5 GA6 GA7 GA8 GA9 GA10 GA11 GA12

Well GB1 GB2 GB3 GB4 GB5 GB6 GB7 GB8 GB9 GB10 GB11 GB12

Well GC1 GC2 GC3 GC4 GC5 GC6 GC7 GC8 GC9 GC10 GC11 GC12

Well GD1 GD2 GD3 GD4 GD5 GD6 GD7 GD8 GD9 GD10 GD11 GD12

Well GE1 GE2 GE3 GE4 GE5 GE6 GE7 GE8 GE9 GE10 GE11 GE12

Well GF1 GF2 GF3 GF4 GF5 GF6 GF7 GF8 GF9 GF10 GF11 GF12

Well GG1 GG2 GG3 GG4 GG5 GG6 GG7 GG8 GG9 GG10 GG11 GG12

Well GH1 GH2 GH3 GH4 GH5 GH6 GH7 GH8 GH9 GH10 GH11 GH12

Well GI1 GI2 GI3 GI4 GI5 GI6 GI7 GI8 GI9 GI10 GI11 GI12

Well GJ1 GJ2 GJ3 GJ4 GJ5 GJ6 GJ7 GJ8 GJ9 GJ10 GJ11 GJ12

Well GK1 GK2 GK3 GK4 GK5 GK6 GK7 GK8 GK9 GK10 GK11 GK12

Well GL1 GL2 GL3 GL4 GL5 GL6 GL7 GL8 GL9 GL10 GL11 GL12

Well GM1 GM2 GM3 GM4 GM5 GM6 GM7 GM8 GM9 GM10 GM11 GM12

Well GN1 GN2 GN3 GN4 GN5 GN6 GN7 GN8 GN9 GN10 GN11 GN12

Well GO1 GO2 GO3 GO4 GO5 GO6 GO7 GO8 GO9 GO10 GO11 GO12

Well GP1 GP2 GP3 GP4 GP5 GP6 GP7 GP8 GP9 GP10 GP11 GP12

Well GQ1 GQ2 GQ3 GQ4 GQ5 GQ6 GQ7 GQ8 GQ9 GQ10 GQ11 GQ12

Well GR1 GR2 GR3 GR4 GR5 GR6 GR7 GR8 GR9 GR10 GR11 GR12

Well GS1 GS2 GS3 GS4 GS5 GS6 GS7 GS8 GS9 GS10 GS11 GS12

Well GT1 GT2 GT3 GT4 GT5 GT6 GT7 GT8 GT9 GT10 GT11 GT12

Well GU1 GU2 GU3 GU4 GU5 GU6 GU7 GU8 GU9 GU10 GU11 GU12

Well GV1 GV2 GV3 GV4 GV5 GV6 GV7 GV8 GV9 GV10 GV11 GV12

Well GW1 GW2 GW3 GW4 GW5 GW6 GW7 GW8 GW9 GW10 GW11 GW12

Well GX1 GX2 GX3 GX4 GX5 GX6 GX7 GX8 GX9 GX10 GX11 GX12

Well GY1 GY2 GY3 GY4 GY5 GY6 GY7 GY8 GY9 GY10 GY11 GY12

Well GZ1 GZ2 GZ3 GZ4 GZ5 GZ6 GZ7 GZ8 GZ9 GZ10 GZ11 GZ12

Well HA1 HA2 HA3 HA4 HA5 HA6 HA7 HA8 HA9 HA10 HA11 HA12

Well HB1 HB2 HB3 HB4 HB5 HB6 HB7 HB8 HB9 HB10 HB11 HB12

Well HC1 HC2 HC3 HC4 HC5 HC6 HC7 HC8 HC9 HC10 HC11 HC12

Well HD1 HD2 HD3 HD4 HD5 HD6 HD7 HD8 HD9 HD10 HD11 HD12

Well HE1 HE2 HE3 HE4 HE5 HE6 HE7 HE8 HE9 HE10 HE11 HE12

Well HF1 HF2 HF3 HF4 HF5 HF6 HF7 HF8 HF9 HF10 HF11 HF12

Well HG1 HG2 HG3 HG4 HG5 HG6 HG7 HG8 HG9 HG10 HG11 HG12

Well HH1 HH2 HH3 HH4 HH5 HH6 HH7 HH8 HH9 HH10 HH11 HH12

Well HI1 HI2 HI3 HI4 HI5 HI6 HI7 HI8 HI9 HI10 HI11 HI12

Well HJ1 HJ2 HJ3 HJ4 HJ5 HJ6 HJ7 HJ8 HJ9 HJ10 HJ11 HJ12

Well HK1 HK2 HK3 HK4 HK5 HK6 HK7 HK8 HK9 HK10 HK11 HK12

Well HL1 HL2 HL3 HL4 HL5 HL6 HL7 HL8 HL9 HL10 HL11 HL12

Well HM1 HM2 HM3 HM4 HM5 HM6 HM7 HM8 HM9 HM10 HM11 HM12

Well HN1 HN2 HN3 HN4 HN5 HN6 HN7 HN8 HN9 HN10 HN11 HN12

Well HO1 HO2 HO3 HO4 HO5 HO6 HO7 HO8 HO9 HO10 HO11 HO12

Well HP1 HP2 HP3 HP4 HP5 HP6 HP7 HP8 HP9 HP10 HP11 HP12

Well HQ1 HQ2 HQ3 HQ4 HQ5 HQ6 HQ7 HQ8 HQ9 HQ10 HQ11 HQ12

Well HR1 HR2 HR3 HR4 HR5 HR6 HR7 HR8 HR9 HR10 HR11 HR12

Well HS1 HS2 HS3 HS4 HS5 HS6 HS7 HS8 HS9 HS10 HS11 HS12

Well HT1 HT2 HT3 HT4 HT5 HT6 HT7 HT8 HT9 HT10 HT11 HT12

Well HU1 HU2 HU3 HU4 HU5 HU6 HU7 HU8 HU9 HU10 HU11 HU12

Well HV1 HV2 HV3 HV4 HV5 HV6 HV7 HV8 HV9 HV10 HV11 HV12

Well HW1 HW2 HW3 HW4 HW5 HW6 HW7 HW8 HW9 HW10 HW11 HW12

Well HX1 HX2 HX3 HX4 HX5 HX6 HX7 HX8 HX9 HX10 HX11 HX12

Well HY1 HY2 HY3 HY4 HY5 HY6 HY7 HY8 HY9 HY10 HY11 HY12

Well HZ1 HZ2 HZ3 HZ4 HZ5 HZ6 HZ7 HZ8 HZ9 HZ10 HZ11 HZ12

Well IA1 IA2 IA3 IA4 IA5 IA6 IA7 IA8 IA9 IA10 IA11 IA12

Well IB1 IB2 IB3 IB4 IB5 IB6 IB7 IB8 IB9 IB10 IB11 IB12

Well IC1 IC2 IC3 IC4 IC5 IC6 IC7 IC8 IC9 IC10 IC11 IC12

Well ID1 ID2 ID3 ID4 ID5 ID6 ID7 ID8 ID9 ID10 ID11 ID12

Well IE1 IE2 IE3 IE4 IE5 IE6 IE7 IE8 IE9 IE10 IE11 IE12

Well IF1 IF2 IF3 IF4 IF5 IF6 IF7 IF8 IF9 IF10 IF11 IF12

Well IG1 IG2 IG3 IG4 IG5 IG6 IG7 IG8 IG9 IG10 IG11 IG12

Well IH1 IH2 IH3 IH4 IH5 IH6 IH7 IH8 IH9 IH10 IH11 IH12

Well II1 II2 II3 II4 II5 II6 II7 II8 II9 II10 II11 II12

Well IJ1 IJ2 IJ3 IJ4 IJ5 IJ6 IJ7 IJ8 IJ9 IJ10 IJ11 IJ12

Well IK1 IK2 IK3 IK4 IK5 IK6 IK7 IK8 IK9 IK10 IK11 IK12

Well IL1 IL2 IL3 IL4 IL5 IL6 IL7 IL8 IL9 IL10 IL11 IL12

Well IM1 IM2 IM3 IM4 IM5 IM6 IM7 IM8 IM9 IM10 IM11 IM12

Well IN1 IN2 IN3 IN4 IN5 IN6 IN7 IN8 IN9 IN10 IN11 IN12

Well IO1 IO2 IO3 IO4 IO5 IO6 IO7 IO8 IO9 IO10 IO11 IO12

Well IP1 IP2 IP3 IP4 IP5 IP6 IP7 IP8 IP9 IP10 IP11 IP12

Well IQ1 IQ2 IQ3 IQ4 IQ5 IQ6 IQ7 IQ8 IQ9 IQ10 IQ11 IQ12

Well IR1 IR2 IR3 IR4 IR5 IR6 IR7 IR8 IR9 IR10 IR11 IR12

Well IS1 IS2 IS3 IS4 IS5 IS6 IS7 IS8 IS9 IS10 IS11 IS12

Well IT1 IT2 IT3 IT4 IT5 IT6 IT7 IT8 IT9 IT10 IT11 IT12

Well IU1 IU2 IU3 IU4 IU5 IU6 IU7 IU8 IU9 IU10 IU11 IU12

Well IV1 IV2 IV3 IV4 IV5 IV6 IV7 IV8 IV9 IV10 IV11 IV12

Well IW1 IW2 IW3 IW4 IW5 IW6 IW7 IW8 IW9 IW10 IW11 IW12

Well IX1 IX2 IX3 IX4 IX5 IX6 IX7 IX8 IX9 IX10 IX11 IX12

Well IY1 IY2 IY3 IY4 IY5 IY6 IY7 IY8 IY9 IY10 IY11 IY12

Well IZ1 IZ2 IZ3 IZ4 IZ5 IZ6 IZ7 IZ8 IZ9 IZ10 IZ11 IZ12

Well JA1 JA2 JA3 JA4 JA5 JA6 JA7 JA8 JA9 JA10 JA11 JA12

Well JB1 JB2 JB3 JB4 JB5 JB6 JB7 JB8 JB9 JB10 JB11 JB12

Well JC1 JC2 JC3 JC4 JC5 JC6 JC7 JC8 JC9 JC10 JC11 JC12

Well JD1 JD2 JD3 JD4 JD5 JD6 JD7 JD8 JD9 JD10 JD11 JD12

Well JE1 JE2 JE3 JE4 JE5 JE6 JE7 JE8 JE9 JE10 JE11 JE12

Well JF1 JF2 JF3 JF4 JF5 JF6 JF7 JF8 JF9 JF10 JF11 JF12

Well JG1 JG2 JG3 JG4 JG5 JG6 JG7 JG8 JG9 JG10 JG11 JG12

Well JH1 JH2 JH3 JH4 JH5 JH6 JH7 JH8 JH9 JH10 JH11 JH12

Well JI1 JI2 JI3 JI4 JI5 JI6 JI7 JI8 JI9 JI10 JI11 JI12

Well JJ1 JJ2 JJ3 JJ4 JJ5 JJ6 JJ7 JJ8 JJ9 JJ10 JJ11 JJ12

Well JK1 JK2 JK3 JK4 JK5 JK6 JK7 JK8 JK9 JK10 JK11 JK12

Well JL1 JL2 JL3 JL4 JL5 JL6 JL7 JL8 JL9 JL10 JL11 JL12

Well JM1 JM2 JM3 JM4 JM5 JM6 JM7 JM8 JM9 JM10 JM11 JM12

Well JN1 JN2 JN3 JN4 JN5 JN6 JN7 JN8 JN9 JN10 JN11 JN12

Well JO1 JO2 JO3 JO4 JO5 JO6 JO7 JO8 JO9 JO10 JO11 JO12

Well JP1 JP2 JP3 JP4 JP5 JP6 JP7 JP8 JP9 JP10 JP11 JP12

Well JQ1 JQ2 JQ3 JQ4 JQ5 JQ6 JQ7 JQ8 JQ9 JQ10 JQ11 JQ12

Well JR1 JR2 JR3 JR4 JR5 JR6 JR7 JR8 JR9 JR10 JR11 JR12

Well JS1 JS2 JS3 JS4 JS5 JS6 JS7 JS8 JS9 JS10 JS11 JS12

Well JT1 JT2 JT3 JT4 JT5 JT6 JT7 JT8 JT9 JT10 JT11 JT12

Well JU1 JU2 JU3 JU4 JU5 JU6 JU7 JU8 JU9 JU10 JU11 JU12

Well JV1 JV2 JV3 JV4 JV5 JV6 JV7 JV8 JV9 JV10 JV11 JV12

Well JW1 JW2 JW3 JW4 JW5 JW6 JW7 JW8 JW9 JW10 JW11 JW12

Well JX1 JX2 JX3 JX4 JX5 JX6 JX7 JX8 JX9 JX10 JX11 JX12

Well JY1 JY2 JY3 JY4 JY5 JY6 JY7 JY8 JY9 JY10 JY11 JY12

Well JZ1 JZ2 JZ3 JZ4 JZ5 JZ6 JZ7 JZ8 JZ9 JZ10 JZ11 JZ12

Well KA1 KA2 KA3 KA4 KA5 KA6 KA7 KA8 KA9 KA10 KA11 KA12

Well KB1 KB2 KB3 KB4 KB5 KB6 KB7 KB8 KB9 KB10 KB11 KB12

Well KC1 KC2 KC3 KC4 KC5 KC6 KC7 KC8 KC9 KC10 KC11 KC12

Well KD1 KD2 KD3 KD4 KD5 KD6 KD7 KD8 KD9 KD10 KD11 KD12

Well KE1 KE2 KE3 KE4 KE5 KE6 KE7 KE8 KE9 KE10 KE11 KE12

Well KF1 KF2 KF3 KF4 KF5 KF6 KF7 KF8 KF9 KF10 KF11 KF12

Well KG1 KG2 KG3 KG4 KG5 KG6 KG7 KG8 KG9 KG10 KG11 KG12

Well KH1 KH2 KH3 KH4 KH5 KH6 KH7 KH8 KH9 KH10 KH11 KH12

Well KI1 KI2 KI3 KI4 KI5 KI6 KI7 KI8 KI9 KI10 KI11 KI12

Well KJ1 KJ2 KJ3 KJ4 KJ5 KJ6 KJ7 KJ8 KJ9 KJ10 KJ11 KJ12

Well KK1 KK2 KK3 KK4 KK5 KK6 KK7 KK8 KK9 KK10 KK11 KK12

Well KL1 KL2 KL3 KL4 KL5 KL6 KL7 KL8 KL9 KL10 KL11 KL12

Well KM1 KM2 KM3 KM4 KM5 KM6 KM7 KM8 KM9 KM10 KM11 KM12

Well KN1 KN2 KN3 KN4 KN5 KN6 KN7 KN8 KN9 KN10 KN11 KN12

Well KO1 KO2 KO3 KO4 KO5 KO6 KO7 KO8 KO9 KO10 KO11 KO12

Well KP1 KP2 KP3 KP4 KP5 KP6 KP7 KP8 KP9 KP10 KP11 KP12

Well KQ1 KQ2 KQ3 KQ4 KQ5 KQ6 KQ7 KQ8 KQ9 KQ10 KQ11 KQ12

Well KR1 KR2 KR3 KR4 KR5 KR6 KR7 KR8 KR9 KR10 KR11 KR12

Well KS1 KS2 KS3 KS4 KS5 KS6 KS7 KS8 KS9 KS10 KS11 KS12

Well KT1 KT2 KT3 KT4 KT5 KT6 KT7 KT8 KT9 KT10 KT11 KT12

Well KU1 KU2 KU3 KU4 KU5 KU6 KU7 KU8 KU9 KU10 KU11 KU12

Well KV1 KV2 KV3 KV4 KV5 KV6 KV7 KV8 KV9 KV10 KV11 KV12

Well KW1 KW2 KW3 KW4 KW5 KW6 KW7 KW8 KW9 KW10 KW11 KW12

Well KX1 KX2 KX3 KX4 KX5 KX6 KX7 KX8 KX9 KX10 KX11 KX12

Well KY1 KY2 KY3 KY4 KY5 KY6 KY7 KY8 KY9 KY10 KY11 KY12

Well KZ1 KZ2 KZ3 KZ4 KZ5 KZ6 KZ7 KZ8 KZ9 KZ10 KZ11 KZ12

Well LA1 LA2 LA3 LA4 LA5 LA6 LA7 LA8 LA9 LA10 LA11 LA12

Well LB1 LB2 LB3 LB4 LB5 LB6 LB7 LB8 LB9 LB10 LB11 LB12

Well LC1 LC2 LC3 LC4

Gene

FAM

Hex

В правой части, в разделе Reaction properties отредактируйте образцы: задайте названия и установите тип исследуемых образцов (Type Positive control для положительных образцов, Type Negative control для отрицательных контрольных образцов, Type Unknown для исследуемых образцов и ВК- (ОКО)).

5. В панели инструментов кликните по значку *Save Experiment*, чтобы сохранить новый эксперимент.

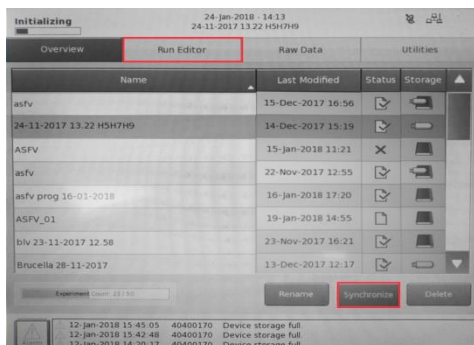


После открытия диалогового окна *Save As* выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите *Save*. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла LightCycler® 96 (.lc96)

6. Эксперимент необходимо перенести в прибор: если прибор подключен через сетевой кабель (либо через WiFi) к компьютеру, то можно загрузить эксперимент через открытую рабочую программу LightCycler96, либо, если прибор автономен, можно воспользоваться USB носителем.

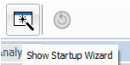
6.1 Перенос эксперимента в прибор с помощью USB носителя

Вставьте USB носитель с сохраненным на нем файлом эксперимента (.lc96) в порт USB, расположенный на правой панели прибора. Как только значок USB  появится на панели состояния программы прибора LightCycler® 96, файл эксперимента будет добавлен в таблицу экспериментов во вкладке *Overview*.



Файлы, сохраненные на USB носителе, обозначены значком . Файлы, сохраненные на приборе, обозначены значком . Файлы, которые хранятся и на приборе и на USB носителе, обозначены двойным значком. Для того чтобы перенести файл на прибор (и наоборот), необходимо нажать Synchronize. Постановку эксперимента можно проводить напрямую с USB носителя, после ее успешного завершения данные будут автоматически сохранены на USB носителе.

6.2. Перенос эксперимента в прибор с помощью рабочей программы LightCycler® 96

После сохранения эксперимента нажмите *Show Startup Wizard* . В появившемся окне выберите *Instrument Manager*:



В поле Instrument должен отображаться прибор *LightCycler*. Затем перейдите на вкладку *Send/Receive Experiment* и в окне *You PC* выберите сохраненный эксперимент и нажмите . Эксперимент будет скопирован в память прибора. Дальнейший запуск программы необходимо производить с помощью сенсорной панели на самом приборе LightCycler® 96.

7. Запуск эксперимента

Эксперимент запускается с помощью сенсорного управления на передней части прибора.

Загрузите плашку либо пробирки с образцами в прибор LightCycler® 96. Нажмите Start на боковой панели общих команд основного окна программы прибора LightCycler®.

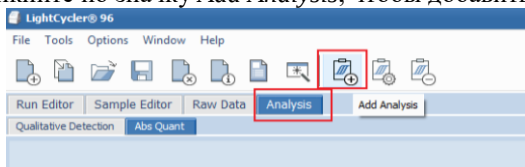


Выберите вкладку *Raw Data*, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

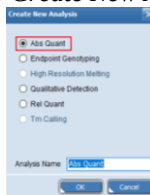
8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

9. Анализ и интерпретация результатов

Откройте файл завершенного анализируемого эксперимента (со значком ) в рабочей программе LightCycler® 96. Откройте вкладку *Analysis*. На панели инструментов кликните по значку *Add Analysis*, чтобы добавить новый анализ.



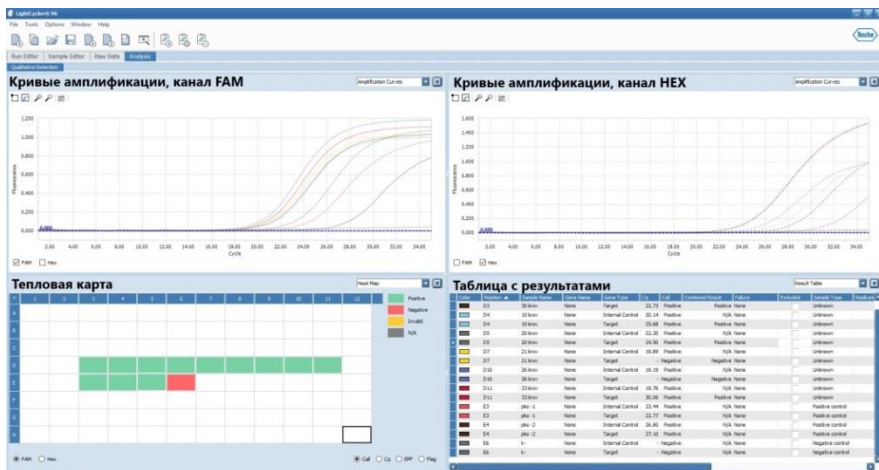
Откроется диалоговое окно *Create New Analysis*. Выберите *Abs Quant*



Нажмите OK. Во вкладке *Analysis* в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента:

- *Кривые амплификации*
- *Стандартные кривые⁶*
- *Тепловая карта*
- *Таблица с результатами*

⁶ окно Стандартные кривые не будет содержать никаких данных, поскольку в наборах не предусмотрен вариант количественного анализа



На тепловой карте (левое нижнее окно на рисунке) зеленым цветом обозначаются положительные образцы, красным цветом обозначаются отрицательные образцы.

Внимание! Необходимо визуально оценить кривые амплификации как в сыром виде (вкладка Raw Date), так и после анализа (вкладка Analysis). Кривые должны иметь классическую s-образную форму. Образцы, форма которых не соответствует классической и для которых на канале FAM (ВКО) наблюдается корректный результат необходимо исключить и считать отрицательными

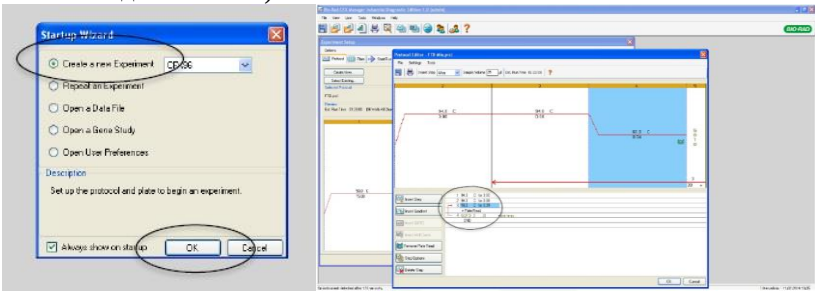
Для образцов форма которых не соответствует классической и для которых на канале FAM (ВКО) наблюдается некорректный или отрицательный результат необходимо провести повторный анализ с этапа экстракции.



Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 4. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)

- 1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
- 2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).



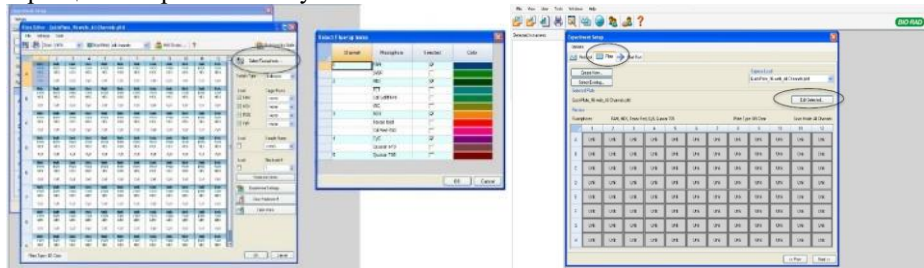
- 3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии параметрами, указанными в таблице 7.

Таблица 7. Температурно-временной режим амплификации на CFX96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95° C – 5 мин	1
2	95°С – 10 сек	40
	60°С – 30 сек, детекция FAM, HEX	
	72°С – 20 сек	

Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

- 4. Задать схему планшета – расположение пробирок и детекцию флуоресцентного сигнала во всех пробирках по используемым каналам в окне **Plate** модуля **Experiment Setup**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores...**, выбрать галочками флуорофоры **FAM** и **HEX** и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по данным каналам. В окне **Sample name** задать название образцов. Сохранить схему планшета.



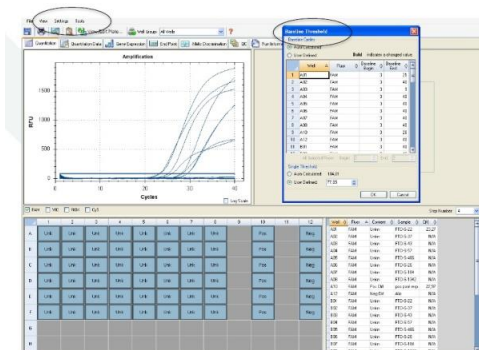
Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «ПЦР-ДНК-ПЛОТЯДНЫХ-1-ФАКТОР» с заданной схемой планшета, нажав кнопку **Start Run**.

6. После окончания выполнения программы можно приступить к анализу результатов с помощью программного обеспечения прибора **CFX96**.

Анализ результатов амплификации для канала FAM (ВКО).

7. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **FAM**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции.



Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «К+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

9. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации для канала HEX (ДНК Mustelidae).

10. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **HEX**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным

ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «K+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

11. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения Ct.

12. Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 5. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 12.02.2018	Раздел «Приложения» Инструкции	Добавлено Приложение 3 «Порядок работы на приборе LightCycler® 96»
Версия 1.2 от 02.04.2021	Раздел «Приложения» Инструкции	Добавлено Приложение 4 «Порядок работы на приборе CFX 96 (Bio-Rad)»
Версия 1.3 от 01.06.2021	стр. 5, стр. 8	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ- буфер, дистиллированную воду
Версия 1.4 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.5 от 29.09.2022	Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК- технология, Россия)	Геометрический (Cp) метод обработки данных заменён на пороговый (Ct)

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

По вопросам качества набора реагентов или по вопросам приобретения «ПЦР-ДНК-ПЛОТЯДНЫХ-1-ФАКТОР» или по вопросам приобретения других тест-систем нашего производства просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу: 108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: vet@faktor.ru