

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

В.Г. Акимкин

« 03 »

сентября

2020 г.



## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

**АмплиСенс® Курица / Индейка-FL**

Только для исследовательских и иных немедицинских целей

**АмплиСенс®**



Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»,  
Российская Федерация, 111123,  
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А



Только для исследовательских и  
иных немедицинских целей

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	5
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ .....	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ....	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК .....	10
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F) .....	12
СОСТАВ.....	12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	12
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	13
А. Подготовка проб для проведения амплификации .....	13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов .....	14
В. Интерпретация результатов.....	14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	17
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....	17
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	18
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	19
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	27
ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....	30

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-G	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® Курица / Индейка-FL не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для выявления ДНК птиц рода *Gallus* (Куры) и рода *Meleagris* (Индейки) в продуктах питания и кормах для животных методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Анализ позволяет обнаруживать последовательности ДНК гена цитохрома Б (*cytB*) митохондриального генома птиц рода *Gallus* (Куры) и рода *Meleagris* (Индейки).

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-G) и одновременной амплификации участков ДНК птиц рода *Gallus* (Куры), ДНК птиц рода *Meleagris* (Индейки) и ДНК ВКО-G с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-

полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация трех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК ВКО-G	ДНК птиц рода <i>Gallus</i> (Куры)	ДНК птиц рода <i>Meleagris</i> (Индейки)

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

### Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения реакции амплификации и идентификации ДНК птиц рода *Gallus* (Куры) и ДНК птиц рода *Meleagris* (Индейки) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитические характеристики оценивались с использованием комплекта для амплификации и детекции «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F и рекомбинантных препаратов ДНК

<b>Аналитическая специфичность</b>	Набор реагентов обнаруживает последовательности ДНК гена <i>cytB</i> , специфичного для митохондриального генома птиц рода <i>Gallus</i> (Куры) и рода <i>Meleagris</i> (Индейки). Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие неспецифических реакций с ДНК различных видов растений, животных
<b>Предел детекции, Limit of detection, LOD</b>	10 <sup>3</sup> копий ДНК/мл последовательностей ДНК-мишеней для идентификации ДНК птиц рода <i>Gallus</i> (Куры) и ДНК птиц рода <i>Meleagris</i> (Индейки)

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования продуктов, содержащих мясные компоненты или сырье животного происхождения с соблюдением требований методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые

- наконечники для автоматических дозаторов с фильтром<sup>1</sup>.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты, насадки для блендера и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и, после отмывания в проточной и деионизованной воде, высушиваются в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
  - Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
  - Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.
  - Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
  - Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
  - Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
  - Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по

---

<sup>1</sup> Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

запросу.

## **СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ**

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку<sup>2</sup>, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»

**ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Взятие исследуемого материала**

1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
3. Одноразовые полиэтиленовые пакеты с застежкой Zip-lock (например, ООО «Промсервис», Россия, или аналогичные).
4. Отдельные для каждой пробы инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы).
5. Одноразовые перчатки.

### **Предварительная подготовка исследуемого материала**

6. Отдельные для каждой пробы инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы).
7. Фарфоровая ступка с пестиком или гомогенизатор.
8. Измельчитель/мельница, или блендер.
9. Одноразовые полиэтиленовые пакеты с застежкой Zip-lock (например, ООО «Промсервис», Россия, или аналогичные).

---

<sup>2</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

10. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
12. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
14. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
15. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
16. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
17. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
18. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

### **Экстракция ДНК из исследуемых образцов**

19. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-С-М» или другие, рекомендованные Изготовителем.
20. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

### **Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
  - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
  - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc.



- («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
  3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
  4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
  5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
  6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
  7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
  8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
  9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
  10. Емкость для сброса наконечников.

## **ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Материалом для исследования служат:

- Сырье животного происхождения (части тушек, фарш и т.д.);

- Пищевые продукты, содержащие компоненты животного происхождения, в том числе продукты, подвергшиеся кулинарной обработке;
- Корма и кормовые добавки для животных, содержащие компоненты животного происхождения.

Отбор проб проводят согласно действующим национальным стандартам и другим регламентирующим документам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевого сырья, продуктов питания и кормов.

При отборе образцов соблюдают меры по предотвращению их загрязнения или изменения их состава.

Отбор образцов проводят с использованием одноразовых перчаток, одноразовых или фламбированных инструментов, одноразовых герметично закрывающихся пластиковых контейнеров или пакетов.

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

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

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК**

При подготовке проб должны быть приняты все меры по предотвращению загрязнения лабораторной пробы и изменения ее состава. Перед отбором пробы для анализа вся лабораторная проба должна быть гомогенизирована.

Для подготовки проб к гомогенизации необходимо использовать одноразовые или фламбированные инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы).

Пробы плотных продуктов, сухих гранулированных и сыпучих продуктов измельчают с использованием автоматических мельниц или блендеров. Для гомогенизации мясных продуктов

используют автоматические гомогенизаторы или фарфоровые ступки и пестики.

Из полученных гомогенатов проводят экстракцию ДНК. Для этого гомогенаты отбирают в одноразовые пластиковые пробирки (емкостью 1,5 мл) в количестве 30-100 мг (что соответствует объему 30-50 мкл в градуированной пробирке). Продукты жидкой консистенции отбирают для экстракции в объеме 100 мкл.

Допускается хранение гомогенатов согласно условиям, рекомендованным для хранения сырья или пищевого продукта.

## ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)

### СОСТАВ

**«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F** – комплект реагентов для амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL Курица / Индейка	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
К+ Курица / Индейка	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО-G	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

### ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

### ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «ДНК-сорб-С-М». Порядок работы с комплектом реагентов «ДНК-сорб-С-М» смотрите в инструкции к используемому комплекту реагентов для экстракции.

## Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-С-М»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-Г**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца для продуктов жидкой консистенции – **100 мкл**, для гомогенатов – **30-100 мг** (что соответствует объему **30-50 мкл** в градуированной пробирке емкостью 1,5 мл).

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**.

## **АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

### **А. Подготовка проб для проведения амплификации**

Выбор пробирок для проведения ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

**Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 10 мкл.**

1. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL Курица / Индейка, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-FL Курица / Индейка, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:
  - **10 мкл ПЦР-смеси-FL Курица / Индейка;**
  - **5 мкл ПЦР-буфера-С;**
  - **0,5 мкл Полимеразы (TaqF).**
3. Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки.
4. Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по **10 мкл ДНК** исследуемых образцов.

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении проб ДНК, экстрагированной с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции

методом сорбции на силикагеле, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

5. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ Курица / Индейка**.
- б) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

## **Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов**

Порядок работы с помощью приборов **Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000** (Corbett Research, Австралия) и **Rotor-Gene Q** (QIAGEN, Германия) смотрите в **Приложении 1**.

Порядок работы с помощью приборов **iCycler iQ5** и **iCycler iQ** (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) смотрите в **Приложении 2**.

Порядок работы с помощью прибора «**ДТ-96**», «**ДТпрайм**» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) смотрите в **Приложении 3**.

Порядок работы с помощью прибора **CFX96** (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) смотрите в **Приложении 4**.

## **В. Интерпретация результатов**

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 2

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК ВКО-G	ДНК птиц рода <i>Gallus</i> (Куры)	ДНК птиц рода <i>Meleagris</i> (Индейки)

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла

(Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 3

### Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			Результат
FAM	JOE	ROX	
<u>Ct ≤ 32</u>	отсутствует или <u>Ct &gt; 35</u>	отсутствует или <u>Ct ≥ 35</u>	ДНК <i>Gallus</i> spp., ДНК <i>Meleagris</i> spp. <b>НЕ обнаружена</b>
определено или отсутствует	<u>Ct ≤ 35</u>	определено или отсутствует	ДНК <i>Gallus</i> spp. <b>обнаружена</b>
определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>Ct ≤ 35</u>	ДНК <i>Meleagris</i> spp. <b>обнаружена</b>
отсутствует или <u>Ct &gt; 32</u>	отсутствует или <u>Ct &gt; 35</u>	отсутствует или <u>Ct &gt; 35</u>	<b>Невалидный*</b>

\* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 4.**

Таблица 4

### Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция ДНК	<u>Ct ≤ 32</u>	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>Ct ≤ 32</u>	<u>Ct ≤ 31</u>	<u>Ct ≤ 31</u>

#### Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 4) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.



## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

**Срок годности.** 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

**Хранение.**

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL Курица / Индейка, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL Курица / Индейка, ПЦР-буфер-С и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL Курица / Индейка хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

## **ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ**





Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Только для исследовательских и иных немедицинских целей		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)**

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

**Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала**

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку.

**ВНИМАНИЕ!** Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
4. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
5. Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
6. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**) и поставить галочку напротив

- позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
7. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
8. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	10 с	–	40
	63	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 с	–	

9. Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
10. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн**. В открывшемся окне **Auto Gain Calibration Setup/Автоматизация уровня сигнала** нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Демек-мых**, пометить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для всех красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение **5**, а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение **10**. В графе **Tube position/Позиция Пробирки** указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр **gain/усиление сигнала**, по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Закрыть окно **Auto Gain Calibration Setup/Автоматизация уровня сигнала**, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.
11. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

12. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

### **Анализ результатов**

#### **Анализ результатов амплификации (канал FAM/Green):**

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. 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/Лог.шкала**).
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

**Анализ результатов по каналам JOE/Yellow и ROX/Orange** провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

<b>Канал</b>	<b><i>Threshold/ Порог</i></b>	<b><i>Dynamic tube/ Динамич.фон</i></b>	<b><i>Slope Correct/ Коррект. уклона</i></b>	<b><i>More Settings/Outlier Removal/ Устранение выбросов</i></b>
FAM/Green	0,05	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,1	включена	включена	10%
ROX/Orange	0,1	включена	включена	10%

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

#### Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.
2. Открыть программу iCycler.
3. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках:
  - Для прибора **iCycler iQ5** в окне ***Selected Plate Setup*** модуля ***Workshop*** нажать кнопку ***Create New*** или ***Edit***. Редактировать схему планшета в режиме ***Whole Plate loading***. В опции ***Select and load Fluorophores*** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE, ROX**. Задать объем реакции (***Sample Volume***) 25 мкл, тип крышек (***Seal Type***): ***Domed Cap***, тип пробирок (***Vessel Type***): ***Tubes***. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку ***Save&Exit Plate Editing***.
  - Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета в окне ***Edit Plate Setup*** модуля ***Workshop***. Для этого в опции ***Samples: Whole Plate Loading*** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне ***Sample Identifier***. В опции ***Select and load Fluorophores*** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM-490, JOE-530, ROX-575**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне ***Plate Setup Filename*** (с расширением .pts) и нажав кнопку ***Save this plate setup*** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее ***Plate Setup***, для этого в окне ***Library*** открыть ***View Plate Setup***, выбрать нужный ***Plate Setup*** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку ***Edit*** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку ***Run with selected protocol***.

#### 4. Задать программу амплификации:

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	40
	63	25 с	FAM, JOE, ROX	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
  - Для прибора **iCycler iQ** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 2 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (например, **Birds.tmo**) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.
5. Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.
6. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета.
- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.



- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

7. После окончания программы приступить к анализу результатов.

### Анализ результатов

1. Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:
  - Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
  - Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
2. Анализ результатов проводить по каналам FAM, JOE, ROX. Результаты обрабатывать для каждого канала по отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.
3. В режиме анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию) поочередно для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне **5-10 %** от максимального значения флуоресцентного сигнала образца **K+**. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

Примечание – Чтобы выделить график образца «К+» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

4. Нажать кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или кнопку **Results** (iCycler iQ5) и вывести на экран таблицу результатов со значениями *Ct*.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 3 ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96», «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

#### Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор, запустить программу RealTime\_PCR v.7.3 или выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста – например, «Птица-идентификация» – и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
  - **Тип** – качественный.
  - **Метод** – Пороговый (**Ct**).
  - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль +, контроль –**.
  - **Контроли**: положительный (K+) – 1, отрицательный (K-) – 1.
  - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл.
  - **Флуорофоры** – **Fam** – ВК, **Hex** – специфика (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать **R6G**) и **Rox** – специфика.
  - **Задать** программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	40
	63	25 с	Fam, Hex/R6G, Rox	
	72	25 с	–	


4. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.

5. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «Птица-идентификация», указать количество образцов и нажать **ОК**.
6. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
7. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
8. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

**ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.

9. Последовательно нажать кнопки **Закрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

### Анализ результатов

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс** для версии программы v.7.5. и выше)
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
  - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
  - **Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования**
  - **Критерии достоверности результата:** поставить галочку, **нижняя граница/порог положительного результата – 30 %**, **верхняя граница/порог нормализации данных – 30 %**.

- **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).
  - Нажать кнопку **Применить**.
5. Отключить **Фитирование** (сглаживание) данных при помощи кнопки **Ф** (отжать кнопку).
  6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне **5-10 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца **K+** в последнем цикле амплификации.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

### ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

#### Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл.

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	40
	63	25 с	FAM, HEX, ROX	
	72	25 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. ниже). Нажать **OK**.

1	95,0	C for 15:00
2	95,0	C for 0:10
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3	63,0	C for 0:25
		+ Plate Read
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	72,0	C for 0:25
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5	GOTO 2	.39 more times
		END

4. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
5. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке

**Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

6. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
7. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

**ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

8. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

### Анализ результатов

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
3. Для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне **5-10 %** от максимального значения флуоресцентного сигнала образца **K+**. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке

характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

Примечание – Чтобы выделить график образца «K+» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.