

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для определения полиморфизма
Pro67His гена бета-казеина CASB у купного рогатого скота
(определение типа молока A1/A2)**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР-РВ	- полимеразная цепная реакция в реальном времени
НК	- нуклеиновая кислота
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ПКО	- положительный контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ТКО	- твердые коммунальные отходы
ПО	- программное обеспечение
ШББ	- шкаф биологической безопасности

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

Набор реагентов для определения полиморфизма Pro67His гена бета-казеина CASB определяющего тип молока A1/A2 крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

1.2 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для определения одной бинарной SNP-мутации Pro67His (C/A) гена CASB в пробах геномной ДНК крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (далее ПЦР-РВ) с использованием аллель-специфичных зондов.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – лабораторная диагностика в ветеринарии, научные исследования. Набор может быть использован в ветеринарных научно-исследовательских и научно-производственных учреждениях, ветеринарных лабораториях и станциях по борьбе с болезнями животных, других подразделениях и учреждениях ветеринарного и ветеринарно-санитарного профиля.

Набор реагентов не подлежит использованию в случаях:

- нарушения внутренней упаковки;
- отсутствия соответствия между описанием и внешним видом реагентов;
- несоблюдения условий транспортирования и хранения согласно инструкции;
- истечения срока годности.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор предназначен для амплификации ДНК методом ПЦР-РВ с флуоресцентной детекцией.

Набор рассчитан на 100 анализируемых проб, включая контрольные образцы.

Набор состоит из 7 реагентов.

№	Состав набора	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь	1 мл	1 пробирка
2.	Разбавитель	1 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО1 С/С	50 мкл	1 пробирка

4.	Положительный контрольный образец, ПКО2 С1А	50 мкл	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО3 А1А	50 мкл	1 пробирка
6.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	200 мкл	1 пробирка
7.	ДНК-полимераза	50 мкл	1 пробирка

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.

Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав набора»). Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, получившего дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

При работе с набором рекомендовано соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса;

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28°C, относительная влажность от 15 до 75%;

- Удалять и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиНом 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;

- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке;

- Соблюдать правила последовательной обработки материала и поточность продвижения исследуемого материала. Лабораторный процесс должен быть

однонаправленным. Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР-РВ с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах. Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое;

— Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;

— Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 15-30 мин;

— Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организаций и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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

— 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;

— Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. Вреден при проглатывании. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

В состав компонентов набора «Реакционная смесь» и «ДНК-полимераза» входят следующие материалы животного происхождения – БСА и рекомбинантная Taq-полимераза, являющиеся биологически безопасными.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или

реализации, поскольку входящие в состав изделия вещества (Taq-полимераза и БСА) являются биологически безопасными.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности изделие является безопасным. Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- канцерогенный эффект отсутствует;
- мутагенное действие отсутствует;
- репродуктивная токсичность отсутствует.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ – имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками – $\lambda_{\text{макс. погл.}}/\lambda_{\text{макс. флуорес.}}$: FAM – 490 нм/520 нм; R6G – 520 нм/550 нм), например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (Bio-Rad, США), RotorGene (Qiagen, Германия), QuantStudio5 (ThermoFisher, США).

Для проведения ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение (ПО), поставляемое производителем прибора:

- программа ANK_Shell версия 100 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М»;
- Bio-Rad CFX Manager 3.1 и выше, поставляемая с прибором CFX-96;
- QuantStudio Design & Analysis Software v 1.4.3 и выше, поставляемая с прибором QuantStudio 5;
- Rotor-Gene Q Series Software и выше, поставляемая с прибором Rotor-Gene.

4.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

4.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 0,5-10 мкл или 2-20 мкл и на 20-200 мкл.

4.4 Другое используемое оборудование

- Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);
- микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903»);
- штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, ООО Синтол);
- морозильник на минус 16-20 °С.

4.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

4.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл; до 10 или 20 мкл;

- отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Материалом для исследования служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб биологического материала крупного рогатого скота.

6 ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-РВ

ПЦР-РВ проводят в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free». Наконечники использовать только с аэрозольным барьером.

6.1 Подготовка к проведению ПЦР-РВ

— Все компоненты набора выдерживают 15 минут при комнатной температуре. Перемешивают переворачиванием компонент «ДНК-полимераза» и на микроцентрифуге-встряхивателе перемешивают остальные компоненты набора. Центрифугируют все компоненты набора в течение нескольких секунд для сброса капель;

— Готовят рабочую реакционную смесь из расчета: **10** мкл реакционной смеси, **10** мкл разбавителя, **0,5** мкл ДНК-полимеразы – на **1** ПЦР пробирку. Для **N** количества исследуемых проб рабочая реакционная смесь составит: **$20.5 * (N+4)$** мкл.

— Рабочую реакционную смесь перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют 3-5 секунд для сброса капель.

— Маркируют ПЦР пробирки в соответствии с протоколом исследования. Вносят в приготовленные ПЦР пробирки по **20** мкл приготовленной рабочей реакционной смеси.

Примечание: для приборов, производящих измерение через крышку пробирки, маркировку необходимо наносить на стенку пробирки (CFX, АНК, QS), для приборов, производящих измерение через стенку пробирки – на крышку (RotorGene).

— Вносят в пробирки (на стенку пробирки) по **5** мкл **ОКО**, исследуемых образцов и **ПКО** в соответствии с маркировкой, используя наконечники с аэрозольным барьером.

— Содержимое стрипованных пробирок кратковременно перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют **20-40 сек** при **3000 об·мин⁻¹** на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл.

ВНИМАНИЕ! После смешивания реакционной смеси и препарата ДНК, в течение **30 мин.** при температуре **+2-8°C**, микропробирки необходимо установить в амплификатор и запустить ПЦР-РВ.

— Помещают микропробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования и прикрывают крышки микропробирок;

— Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;

— Вводят параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблицам 1-3 и вводят красители FAM (Green) и R6G (HEX, Yellow/VIC). Для приборов Rotor-Gene устанавливают следующие значения уровня сигнала: Green – 5, Yellow – 5;

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации для приборов **CFX**, **АНК**:

№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	95 °C – 120 секунд	1
2	95 °C – 20 секунд	40
3	63 °C – 40 секунд Считывание сигнала флуоресценции (FAM, R6G)	

Таблица 2 – Температурно-временной режим амплификации для приборов **RotorGene**:

Шаг	Темп., °C	Время	Детекция	Повторов
Hold	94	3 mins	No acquiring	1
Cycling 1	94	20 secs	No acquiring	10
	58	20 secs	No acquiring	
	61	30 secs	No acquiring	
Cycling 2	94	20 secs	No acquiring	30
	58	20 secs	No acquiring	
	61	30 secs	Acquiring on Green, Yellow	

Таблица 3 – Температурно-временной режим амплификации для приборов QuantStudio:

Шаг	Стадия	Температура	Время	Скорость нагрева/охлаждения	Регистрация сигнала	Число циклов
1	Pre-Read Stage	63°C	30 сек	1,6°C/s		1
1	Удержание (Hold Stage)	95°C	300 сек	1,6°C/s		1
1	ПЦР (PCR Stage)	95°C	15 сек	1,6°C/s		40
2		63°C	40 сек	1,6°C/s		
1	Post-Read Stage	63°C	30 сек	1,6°C/s		1

— Вводят сведения об образцах по всем красителям и активируют прибор в соответствии с руководством по эксплуатации;

— Закрывают крышку прибора, запускают реакцию ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора, расчетное время анализа составляет в среднем 1,5 часа.

Примечание: Порядок запуска различных моделей амплификаторов (RG, CFX, ANK, QS) указан в **Приложении** (страница 10).

6.2 Анализ и интерпретация результатов

Оценку результатов проводят с помощью ПО приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)», «CFX-96» или эквивалентных им (см. п. 5.1 настоящей инструкции). Критерием регистрации роста сигнала флуоресценции (наличие кинетической кривой роста сигнала флуоресценции) в ПО приборов является величина порогового цикла C_t , которая означает любую величину менее **40**. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается ПО прибора, например, как предельная величина порогового цикла (**$C_t \geq 40$** в приборах «АНК»), либо как ее отсутствие (**N/A** в приборах фирмы «BioRad») и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов проводится в соответствии с таблицей:

Варианты	C (Pro67) FAM	A (His67) R6G	Молоко
Гомозигота CC	+	-	A2
Гетерозигота CA	+	+	A2/A1
Гомозигота AA	-	+	A1
ОКО	-	-	
ПКО1 C\С	+	-	
ПКО2 C\A	+	+	
ПКО3 A\A	-	+	

Фланкирующая последовательность:

acagtctctagtctatcccttcctgggcccaccc(C>A)taacagcctcccacaaaacatccctcctc

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

7.1 Условия хранения набора

Набор реагентов хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 16 до минус 20 °С.

Суммарный срок хранения набора для проведения ПЦР-РВ при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не должен превышать 5 суток в течение срока годности набора реагентов.

7.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным), при температуре от минус 16 до минус 20°С с соблюдением требований «холодовой цепи» в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой. Допускается транспортирование набора для проведения ПЦР-РВ до 5 суток при температуре до плюс 8°С с соблюдением требований «холодовой цепи» в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой.

7.3 Условия эксплуатации и срок годности набора

Набор реагентов должен применяться согласно утвержденной инструкции по применению. Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем.

Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

7.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ и автоматической станции после выделения РНК, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение с целью последующей инактивации (МУ 1.3.2569-09) и утилизации согласно требованиям (СанПиН 2.1.3684-21).

Использованные пробирки, пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь или салфетки для обработки поверхностей ШББ, автоматической станции после выделения ДНК, в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 (либо специально предназначенное вспомогательное помещение) (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21.

Набор реагентов с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, а также являющиеся подделками или незаконными копиями изделий, а также изделия, обнаруженные и конфискованные таможенными органами Российской Федерации при их ввозе на территорию Российской Федерации, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТКО (СанПиН 2.1.3684-21).

7.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять на предприятие-изготовитель ООО «Синтол»: г. Москва, 127550, Тимирязевская ул, д. 42, тел. (495)984-69-93, факс. (499)977-74-55, Email: syntol@syntol.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

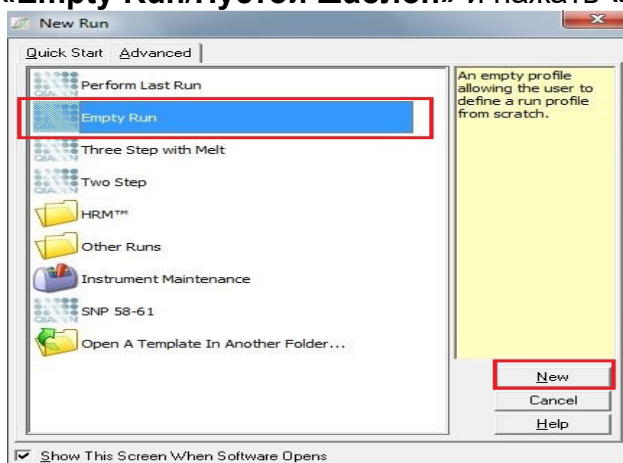
9. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Температурный диапазон		Обратитесь к инструкции по применению
	Использовать до		Номер по каталогу
	Код партии (серия)		Изготовитель
	Дата производства		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. Проведение ПЦР-РВ на приборах RotorGene6000/RotorGeneQ

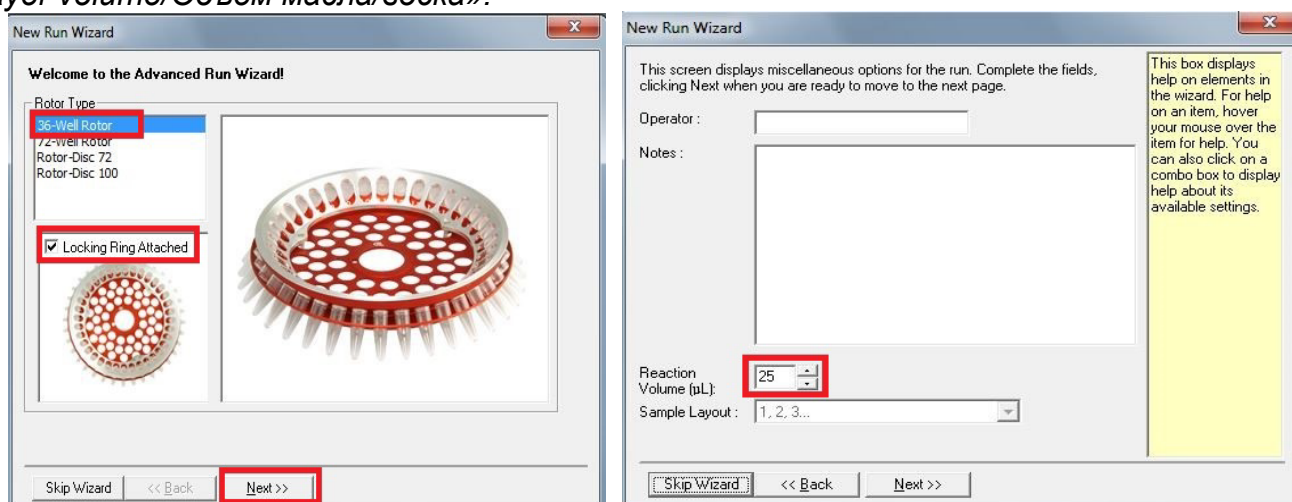
1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу «Rotor-Gene».
3. В окне «New Run/Новый тест» выбрать вкладку «Quick Start/Быстрый старт» и выбрать шаблон «Генетика КРС».
- 3.1 *Создание шаблона «Генетика КРС»*
- 3.1.1 В окне «New Run/Новый тест» выбрать вкладку «Advanced/Детальный мастер», затем опцию «Empty Run/Пустой шаблон» и нажать «New/Новый».



3.1.2 В открывшемся окне выбрать тип ротора «36-Well Rotor/36-луночный ротор» и поставить галочку в окне «Locking Ring Attached/Кольцо закреплено», нажать «Next/Далее».

3.1.3 В открывшемся окне установить «Reaction Volume/Объем реакции» 25 мкл и нажать «Next/Далее».

Примечание: В ранних версиях программы необходимо убрать галочку «15 μ L oil layer volume/Объем масла/воска».



3.1.4 В открывшемся окне нажать кнопку «Edit Profile/Редактор профиля», нажать «New/Новый» и выбрать «Cycling (default)/Циклирование (по умолч.)». Задать программу амплификации со следующими параметрами:

Шаг	Темп., °C	Время	Детекция	Повторов
Hold	94	3 mins	No acquiring	1
Cycling 1	94	20 secs	No acquiring	10
	58	20 secs	No acquiring	
	61	30 secs	No acquiring	
Cycling 2	94	20 secs	No acquiring	30
	58	20 secs	No acquiring	
	61	30 secs	Acquiring on Green, Yellow	

3.1.5 В окне **«Edit Profile/Редактор профиля»** нажать кнопку **«OK»**.

3.1.6 Установить чувствительность прибора в области настроек **«Chanel Setup/Установка канала»**, используя клавишу **«Edit Gain/Уровень сигнала»**:

Green – 5

Yellow – 5

3.1.7 Нажать клавишу **«Next/Далее»**.

3.1.8 Сохранить шаблон нажав **«Save Template/Сохранить шаблон»**. Необходимо сохранять шаблон в папку с программным обеспечением прибора, например, *C:\Program Files (x86)\Rotor-Gene 6000 Software\Templates\Quick Start Templates*

4. В открывшемся окне выбрать тип ротора **«36-Well Rotor/36-луночный ротор»** и поставить галочку в окне **«Locking Ring Attached/Кольцо закреплено»**, нажать **«Next/Далее»**.

5. В открывшемся окне нажать **«Next/Далее»**. В следующем окне также нажать **«Next/Далее»**.

6. Запустить амплификацию кнопкой **«Start run/Старт»**.

7. В появившемся после начала работы прибора окне со сведениями об образцах внести названия образцов, в столбце **«Type/Тип»** указать **«Unknown/Образец»** для образцов, **«Positive/Положительный»** для ПКО и **«Negative/Отрицательный»** для ОКО. Нажать клавишу **«Finish/ Закончить»**.

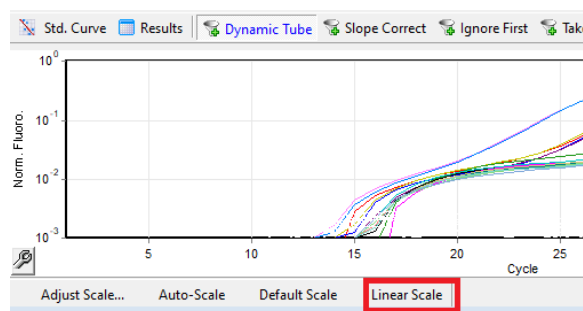
Порядок оценки результатов ПЦР-РВ для приборов RotorGene6000/RotorGene

1. После завершения амплификации открыть нужный файл в программе **«Rotor-Gene»**.

2. Нажать в меню программы **«Rotor-Gene»** клавишу **«Analysis/Анализ»**, выбрать закладку **«Quantitation/Количественный»**.

3. Выбрать строку с красителем **(Green/Yellow)** и нажать клавишу **Show/Показать**. В открывшемся окне появятся кинетические кривые в логарифмической шкале.

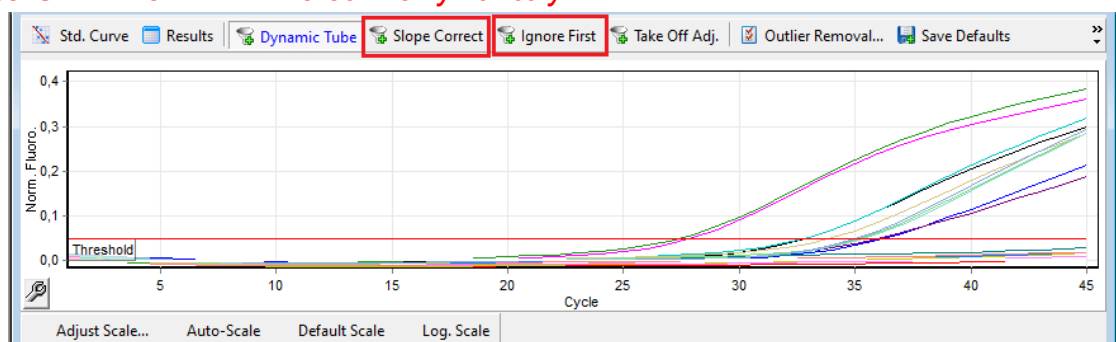
4. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**.



5. В меню окна **«Quantitation Analysis/Количественный анализ»** активировать:

«Dynamic Tube/Динамич. фон»

«Slope Correct/Коррект. уклона» *Примечание. При выполнении операции «Коррекция уклона» необходимо следить, чтобы не происходило кардинальных изменений в рисунке кинетических кривых (например, кривые без подъема флуоресценции после «коррекции уклона» преобразуются в линии с положительной динамикой флуоресценции и углом наклона). Если в результате проведения данной операции происходят кардинальные изменения в рисунке кинетических кривых, то операцию «Коррекция уклона» можно проводить **ТОЛЬКО** для образцов с подъемом флуоресценции в данном канале, т.е. **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ** по данному каналу!*



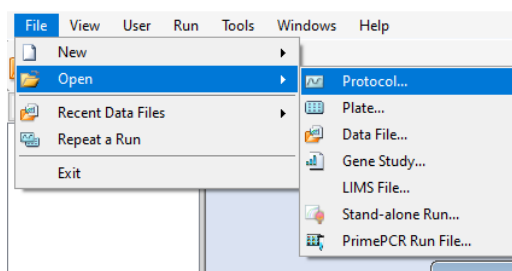
6. В меню **«CT Calculation/Вычисление СТ»** установить значение для пороговой линии **«Threshold/Порог» - 0,1**.

7. **«Outlier Removal/Устранение выбросов» - 10%** *Примечание. Данную операцию необходимо выполнять **ТОЛЬКО** при необходимости устранения из анализа ложноположительных образцов, пересекающих пороговую линию из-за фоновых флуктуаций флуоресценции кривой.*

8. По завершении отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

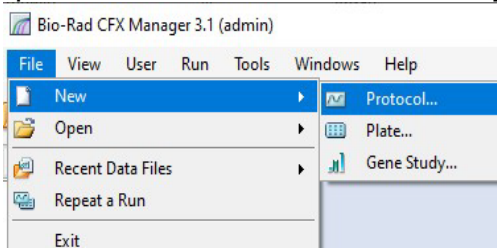
2. Проведение ПЦР-РВ на приборах CFX96

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу **«Bio-Rad CFX Manager»** или **«Bio-Rad CFX Maestro»**
3. Открыть протокол **«Генетика КРС»**. Для этого в меню **File/Файл** выбрать **Open/Открыть** → **Protocol/Протокол** и открыть протокол **«Генетика КРС»**.



3.1 Создание протокола «Генетика КРС»

В меню **File/Файл** выбрать **New/Создать**→**Protocol/Протокол**.



В появившемся окне задать циклограмму со следующими параметрами:

Sample Volume **25 µl**

1. 95,0 C for 2:00

2. 95,0 C for 0:20

3. 63,0 C for 0:40

+Plate read

4. GOTO 2, 39

END

Нажать **ОК** и сохранить протокол на компьютере в удобной рабочей папке.

4. Внести сведения об образцах и красителях. Для этого во вкладке **Plate/Плашка** выбрать опцию **Create New/Создать**. Курсором выделить поле с лунками, в которых установлены пробирки, и в графе **Sample Type/Тип пробы** временно обозначить все занятые лунки как **Unknown/Неизвестен**, выбрав соответствующую строчку **Unknown/Неизвестен**.

5. Нажать кнопку **Select Fluorophores/Выбрать флуорофоры**. В появившемся окне выбрать красители **FAM, HEX**. Нажать **ОК**. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям: поставить «галочки» в колонке **Load/Загрузить** напротив названий всех выбранных красителей.

6. Обозначить на плашке месторасположение образцов:

- Первая лунка – **ПКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ПКО, и в графе **Sample Type/Тип пробы** выбрать строчку **Positive Control/Положительный контроль**.

- Вторая лунка – **ОКО**. Для этого выделить лунку, в которой находится пробирка с ОКО, и в графе **Sample Type/Тип пробы** выбрать строчку **Negative Control/Отрицательный контроль**.

- Следующая лунка - исследуемый образец 1, затем – исследуемый образец 2 и т.д. в соответствии с п. **Порядок следования образцов**.

7. Задать названия всех исследуемых образцов. Для этого выделить лунки, в которых находятся пробирки с обозначаемым образцом. В графе **Sample Name/Имя пробы** ввести (или выбрать из уже имеющихся) имя соответствующего образца. Затем поставить галочку в соседней графе **Load/Загрузить**. Повторить то же самое для оставшихся образцов.

8. Нажать **ОК**. Дать имя плашке с указанием даты эксперимента и сохранить полученный файл на компьютере в удобной рабочей папке.

9. Начать работу прибора. Для этого выбрать закладку **Start Run/Начать прогон**, в которой нажать клавишу **Start Run/Начать прогон**. Задать имя будущего файла с указанием даты проведения эксперимента. Сохранить файл на компьютере в удобной рабочей папке.

10. Зафиксировать в рабочем журнале название файла.

11. Отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

3. Проведение ПЦР-РВ на приборах АНК-32 (32М, 48)

3.1 Запуск программы прибора АНК-32 (32М, 48) без использования встроенного шаблона «Генетика КРС»

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу **ANK Shell**.



3. Выбрать вкладку **«Быстрый старт»**.

В появившемся окне выбрать красители **FAM, R6G**. Задать имя будущего файла, а также выбрать тип прибора (32 пробирки или 48 пробирок).

4. В окне **«Амплификатор»** задать программу амплификации.

Тип	Температура, Т, С	Время, t, сек.	Наблюдение	Расчет
Изотерма				
1	95	120	Включено	
Циклограмма (45)				
1	95	20	Включено	
2	63	40	Включено	Включено

5. Во вкладке **«Образцы»** внести описание исследуемых образцов и расставить образцы по планшету. Нажать кнопку **«Применить»**.

6. Занести в рабочий журнал название файла данных, соответствующее исследованию.

7. Для запуска исследования нажать **«Старт»**.

8. В открывшемся окне «Выбор прибора» выбираем нужный амплификатор и нажимаем на «галочку» - 

9. Отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

3.2 Запуск программы прибора АНК-32 (32М, 48) с использованием встроенного шаблона «Генетика КРС»

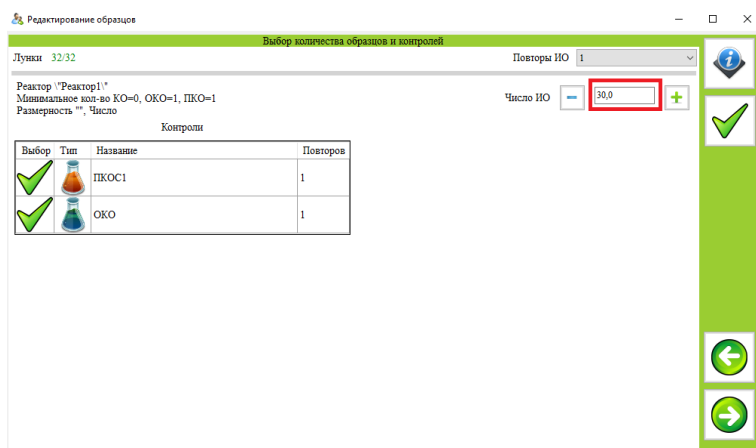
Примечание В случае отсутствия встроенного шаблона можно проводить запуск программы прибора через функцию **«Быстрый старт»** (см. п.7.2.3.1 настоящей инструкции).

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустить программу **ANK Shell**.

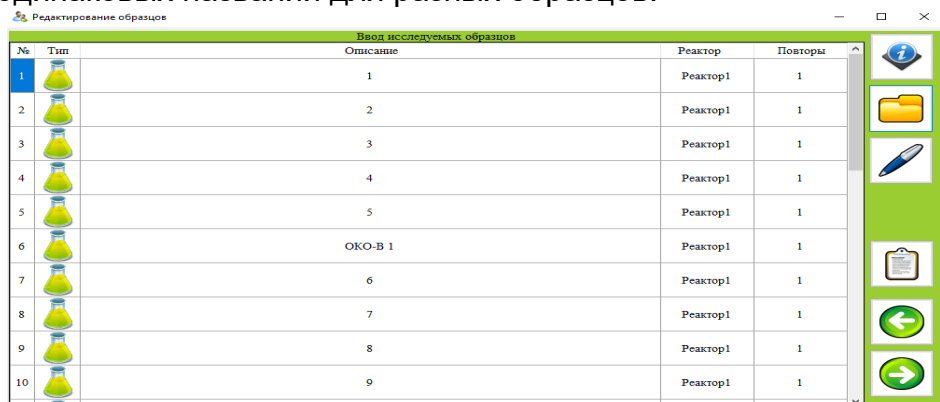
3. Выбрать вкладку **«Новое исследование»**. Во вкладке **«Новое исследование»** выбрать шаблон **«Генетика КРС»**, а также выбрать тип прибора (32 пробирки или 48 пробирок).



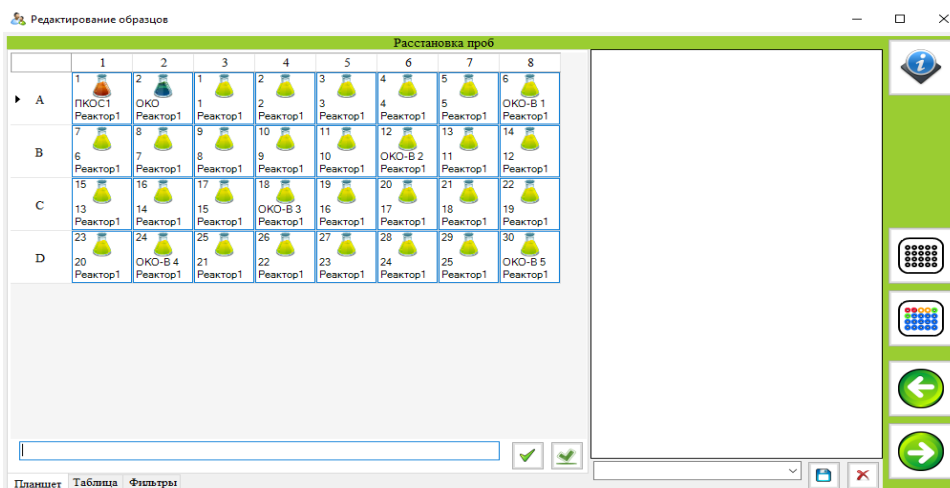
4. В окне **«Выбор количества образцов и контролей»** указать количество образцов.



5. В окне **«Ввод исследуемых образцов»** внести описание исследуемых образцов. Необходимо ввести все исследуемые образцы, в противном случае они будут заблокированы, и программа не будет выполнять с ними расчетных действий. Не допускается одинаковых названий для разных образцов!



6. Во вкладке **«Расстановка проб»** расставить образцы по планшету.



7. Занести в рабочий журнал название файла данных, соответствующее исследованию.

8. Для запуска исследования нажать **Старт**.

9. В открывшемся окне «Выбор прибора» выбираем нужный амплификатор и

нажимаем на «галочку» - 

4. Проведение ПЦР-РВ на приборах QuantStudio5.

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

2. Запустить программу «QuantStudio Designs & Analysis Software».

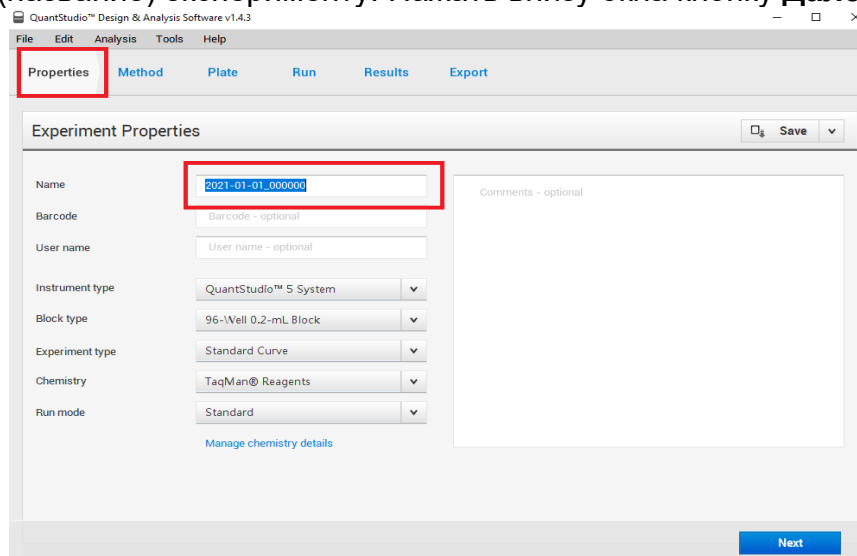
3. Нажать кнопку **Открыть эксперимент (Open Existing Experiment)**. В открывшемся окне выбрать протокол «Генетика КРС» и нажать кнопку **Открыть (Open)**.

3.1 *Создание протокола «Генетика КРС»*

3.1.1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

3.1.2. Запустить программу «QuantStudio Designs & Analysis Software».

3.1.3. Нажать кнопку **Создать эксперимент (Create New Experiments)** . Во вкладке **Свойства (Properties)** в строке **Название (Name)** задать имя (название) эксперименту. Нажать внизу окна кнопку **Далее (Next)**.



3.1.4. Во вкладке **Протокол (Method)** задать циклограмму со следующими параметрами:

Объем (Volume) 25 µl

Шаг	Стадия	Температура	Время	Скорость нагрева/охлаждения	Регистрация сигнала	Число циклов
1	Pre-Read Stage	63°C	30 сек	1,6°C/s		1
1	Удержание (Hold Stage)	95°C	300 сек	1,6°C/s		1
1	ПЦР (PCR Stage)	95°C	15 сек	1,6°C/s		40
2		63°C	40 сек	1,6°C/s		
1	Post-Read Stage	63°C	30 сек	1,6°C/s		1

Нажать кнопку **Далее (Next)**.

3.1.5. В открывшемся окне во вкладке **Быстрая Настройка (Quick Setup)** в графе **Пассивный референсный краситель (Passive Reference)** выбрать **HET (None)**, нажав на стрелку.

Plate Attributes

Passive Reference

None ▼

3.1.6. Во вкладке **Расширенные настройки (Advanced Setup)** в блоке **Мишени (Targets)** добавить каналы для считывания флуоресценции. Для этого необходимо выполнить следующие действия:

- В первой строке в графе **Название (Name)** вместо Target 1 написать FAM. В графе **Репортер (Reporter)** выбрать **FAM**. В графе **Гаситель (Quencher)** выбрать **None**, нажав на ячейку.

- Нажать на кнопку **Добавить (Add)**. В появившейся строке в графе **Репортер (Reporter)** выбрать **VIC**. В графе **Название (Name)** написать HEX. В графе **Гаситель (Quencher)** выбрать **None**, нажав на ячейку.

3.1.7. Для сохранения протокола нажать кнопку **Сохранить (Save)**



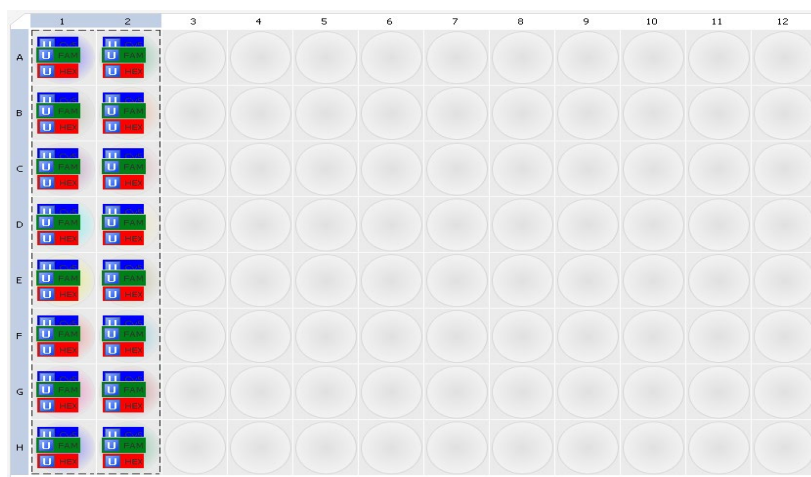
. Сохранить протокол «Генетика КРС» в удобную папку.

4. Перейти во вкладку **Планшет (Plate)** и нажать на вкладку **Расширенные Настройки (Advances Setup)**.

5. Ввод образцов производится в таблице Excel, которая устанавливается вместе с ПО.

6. Скопировать получившуюся таблицу в программу прибора. Выделить все образцы и в таблице поставить галочки возле флуоресцентных красителей.

Нажать кнопку **Далее (Next)**.



7. Начать работу прибора. Для этого нажмите на кнопку **Начать прогон (Start Run)** и выбрать нужный серийный номер прибора. Задать имя будущего файла с указанием даты проведения эксперимента. Сохранить файл на компьютере в удобной рабочей папке.

8. Зафиксировать имя файла в рабочем журнале.

9. Отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Порядок оценки результатов ПЦР-РВ для приборов QuantStudio

Открыть обрабатываемый файл.

Если на вкладке **Результаты (Results)** не отображаются данные, нажать кнопку **Анализ (Analyze)**.

1. На вкладке **Результаты (Results)** выбрать график **Дискриминации Аллелей (Allelic Discrimination Plot)** из выпадающего списка.
2. Чтобы настроить график, необходимо нажать , затем выбрать интересующий анализ **SNP-анализ**, далее **Тип графика: Cartesian**.
3. Убедитесь, что образцы на графике распределились на кластеры, в соответствии с тремя вариантами генотипов, при этом нужно ориентироваться на положение на графике контрольных образцов.