

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора
ФГУП «ВНИИОФИ»



И.С. Филимонов

«13» 02 2020 г

Государственная система обеспечения единства измерений

**Анализаторы автоматические для проведения ПЦР-анализа в режиме
реального времени LightCycler 96 Instrument с принадлежностями**

**МЕТОДИКА ПОВЕРКИ
МП 058.Д4-19**

Главный метролог
ФГУП «ВНИИОФИ»

С.Н. Негода

«13» 02 2020 г

Главный научный сотрудник
ФГУП «ВНИИОФИ»

В.Н. Крутиков

«13» 02 2020 г

Москва
2020 г.

Введение

Настоящая методика поверки распространяется на Анализаторы автоматические для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени LightCycler 96 Instrument с принадлежностями (далее – анализаторы), производства Roche Diagnostics GmbH, Германия, предназначенные для выявления специфической последовательности нуклеиновых кислот и измерения концентрации фрагментов целевой дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в режиме реального времени в биологических образцах при выполнении полимеразной цепной реакции (ПЦР) путем измерения интенсивности флуоресценции и устанавливает порядок, методы и средства проведения первичной и периодических поверок.

Интервал между поверками – 1 год.

1 Операции и средства поверки

1.1 Поверку средств измерений осуществляют аккредитованные в установленном порядке в области обеспечения единства измерений юридические лица и индивидуальные предприниматели.

1.2 При проведении поверки должны быть выполнены операции, перечисленные в таблице 1.

Таблица 1 – Операции поверки

Наименование операций	Номер пункта документа по поверке	Обязательность выполнения операции	
		Первичная поверка	Периодическая поверка
Внешний осмотр	5.1	Да	Да
Опробование. Проверка программного обеспечения	5.2	Да	Да
Определение (контроль) метрологических характеристик	5.3	Да	Да
Проверка диапазона измерений интенсивности флуоресценции	5.3.1	Да	Да
Определение пределов допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции	5.3.2	Да	Да

1.3 При получении отрицательных результатов при проведении хотя бы одной операции поверка прекращается.

2 Средства поверки

2.1 При проведении поверки должны применяться средства, указанные в таблице 2.

Таблица 2 – Средства поверки

Номер пункта методики поверки	Наименование средства поверки; номер документа, регламентирующего технические требования к средству, основные технические характеристики.
5.3	Рабочий эталон по ГПС «Государственная поверочная схема для средств измерений массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации, а также флуоресценции компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе спектральных методов», утвержденная Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 3455 от 30 декабря 2019 г.:

Продолжение таблицы 2

Номер пункта методики поверки	Наименование средства поверки; номер документа, регламентирующего технические требования к средству, основные технические характеристики.
5.3	<p>диапазон измерений от 10^{-5} до 10^5 ОЕФ, доверительные границы относительной погрешности измерений от 0,3 до 15,0 %.</p> <p>Дозатор механический одноканальный ВЮНИТ (ГРСИ № 36152-12): диапазон объемов дозирования от 10 до 100 мкл; допускаемое относительное отклонение среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального при температуре (22 ± 2) °С от $\pm 3,0$ до $\pm 0,8$ %.</p> <p>Вспомогательное оборудование: Низкопрофильные пробирки стрипа, производства компании Roche Diagnostics GmbH; дистиллированная вода по ГОСТ 6709-72.</p>

2.2 Допускается применение средств поверки, не приведенных в таблице 2, но обеспечивающих определение метрологических характеристик с требуемой точностью.

2.3 Средства измерений, указанные в таблице 2, должны быть поверены и аттестованы в установленном порядке.

3 Требования к квалификации поверителей и требования безопасности

3.1 К проведению поверки допускаются лица:

- прошедшие обучение на право проведения поверки по требуемому виду измерений и знающие основы метрологического обеспечения средств измерений;
- изучившие настоящую методику поверки и эксплуатационную документацию на анализаторы.

3.2 При проведении поверки должны быть соблюдены требования безопасности, приведенные в Руководстве по эксплуатации на анализаторы.

4 Условия поверки

4.1 При проведении поверки следует соблюдать следующие условия:

- температура воздуха от 19 до 21 °С;
- относительная влажность воздуха, не конденсирующаяся, от 40 до 80 %;
- атмосферное давление от 97,3 до 105,3 кПа.

4.2 Помещение должно быть свободно от пыли, паров кислот и щелочей.

5 Проведение поверки

5.1 Внешний осмотр

5.1.1 Проверку внешнего вида анализатора проводят путем визуального осмотра. Проводят сравнение фотографических изображений, напечатанных в описании типа на данный анализатор, и образца представленного на поверку.

5.1.2 Провести визуальный осмотр анализатора на отсутствие видимых повреждений, влияющих на его работоспособность. Убедиться о наличии маркировки с ясным указанием типа и серийного номера анализатора.

5.1.3 Проверить комплектность анализатора (без запасных частей и расходных материалов) на соответствие требованиям описания типа на данный анализатор.

5.1.4 Анализатор считают прошедшим операцию поверки, если:

- внешний вид анализатора соответствует фотографическим изображениям из описания типа на данный анализатор;
- корпус, внешние элементы, элементы управления и индикации не повреждены;

- комплектность соответствует требованиям описания типа на данный анализатор;
- маркировка анализатора содержит сведения о производителе, типе и серийном номере прибора

5.2 Опробование. Проверка программного обеспечения

5.2.1 Включить анализатор в электросеть. Анализатор включается с помощью выключателя, расположенного на задней панели анализатора.

Анализатор имеет сенсорный дисплей, программа на котором запускается при включении анализатора. Кроме того, имеется программное обеспечение к анализатору, которое устанавливается на портативный компьютер (далее – ПК) и может быть запущено пользователем как при включении прибора, так и в его отсутствие.

5.2.2 При использовании программы, встроенной в анализатор и отображающейся на сенсорном дисплее прибора, необходимо выбрать вкладку «Utilities» в верхней панели дисплея (рисунок 1). В появившемся окне выбрать вкладку «Instrument», в которой будет указана версия программного обеспечения (далее – ПО) (рисунок 2).



Рисунок 1 – Часть сенсорного экрана анализатора LightCycler 96

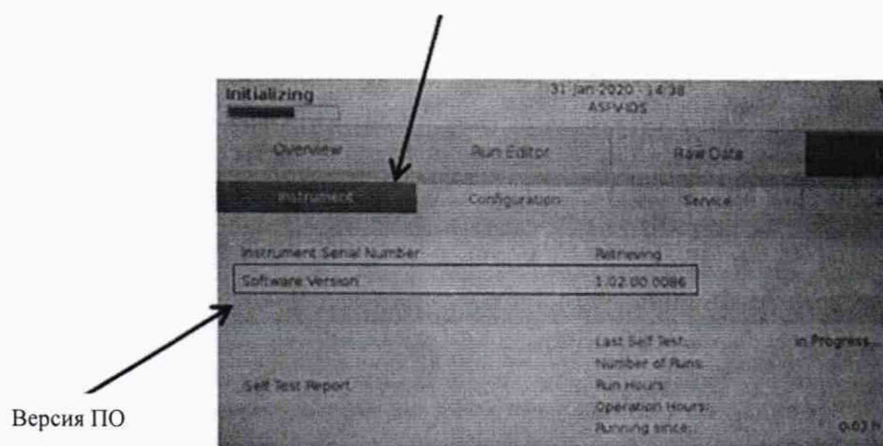


Рисунок 2 – Отображение версии ПО во вкладке «Instrument»

5.2.3 При использовании программного обеспечения, установленного на ПК, выбрать в верхней панели «Help» - «About...» (рисунок 3). Появится отдельное информационное окно, в котором будет указана версия ПО.

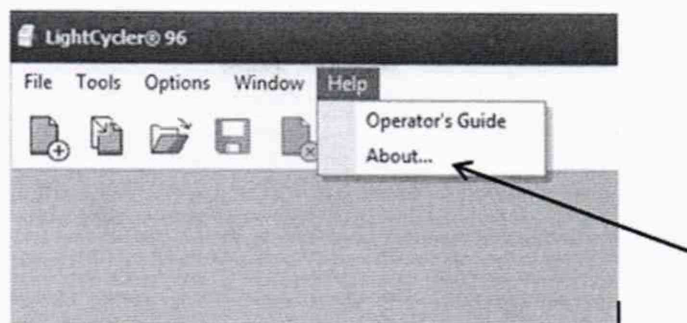


Рисунок 3 – Верхняя панель программы LightCycler 96

- 5.2.4 Анализатор считает прошедшим операцию опробования, если
- на дисплее анализатора появилось главное меню;
 - версии ПО анализатора и ПО, установленного на ПК, соответствуют таблице 3.

Таблица 3 – Идентификационные данные программного обеспечения

Идентификационные данные (признаки)	Значение
Идентификационное наименование ПО	LightCycler® 96
Номер версии (идентификационный номер) ПО	не ниже 1.01.00.0000.
Цифровой идентификатор ПО	Данные являются собственностью производителя и являются защищёнными для доступа дилера и пользователей

5.3 Определение (контроль) метрологических характеристик

Перед проведением поверки необходимо установить параметры экспериментов для запуска измерений в соответствии с Приложением Б настоящей методики поверки.

5.3.1 Проверка диапазона измерений интенсивности флуоресценции.

5.3.1.1 Проверку диапазона измерений интенсивности флуоресценции совмещают с определением относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции.

5.3.1.2 Анализатор считают прошедшим операцию поверки, если диапазон измерений интенсивности флуоресценции составляет от 0,01 до 15,00 ОЕФ.

5.3.2 Определение пределов допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции.

5.3.2.1 Разместить дистиллированную воду объемом 50 мкл в каждую из восьми низкопрофильных пробирок стрипа.

5.3.2.2 Произвести пятикратное измерение интенсивности флуоресценции (см. Приложение Б) дистиллированной воды на длине волны возбуждения 470 нм и длине волны эмиссии 514 нм.

5.3.2.3 По результатам измерений рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции дистиллированной воды, $I_{\text{дист.ср.}j}$, усл.ед., для каждой пробирки j стрипа по формуле (1).

$$I_{\text{дист.ср.}j} = \frac{\sum_{i=1}^n I_{\text{д.}i,j}}{n}, \quad (1)$$

где $I_{\text{д.}i,j}$ – измеренное значение интенсивности флуоресценции дистиллированной воды, усл.ед.;

j – порядковый номер низкопрофильной пробирки в стрипе, от 1 до 8;

n – число измерений, равное 5.

5.3.2.4 Разместить меру, действительное значение которой находится в середине диапазона измерений анализатора, (далее – мера В) объемом 50 мкл в каждую из восьми низкопрофильных пробирок стрипа.

5.3.2.5 Произвести пятикратное измерение интенсивности флуоресценции (см. Приложение Б) меры В на длине волны возбуждения 470 нм и длиной волны эмиссии 514 нм.

5.3.2.6 По результатам измерений рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции меры В, $I_{\text{меры}B_{\text{ср},j}}$, усл.ед., для каждой пробирки j стрипа по формуле (2).

$$I_{\text{меры}B_{\text{ср},j}} = \frac{\sum_{i=1}^n I_{i,j}}{n}, \quad (2)$$

где I_i – измеренное значение интенсивности флуоресценции меры, усл.ед.;

j – порядковый номер низкопрофильной пробирки в стрипе, от 1 до 8;

n – число измерений, равное 5.

5.3.2.7 Рассчитать действительное значение интенсивности флуоресценции меры В, $\Delta I_{\text{меры}B_j}$, усл.ед., для каждой пробирки стрипа за вычетом фона по формуле (3).

$$\Delta I_{\text{меры}B_j} = I_{\text{меры}B_{\text{ср},j}} - I_{\text{дист}_{\text{ср},j}}. \quad (3)$$

5.3.2.8 На основании результатов измерений рассчитать коэффициент градуировки $K_{\text{меры}B_j}$, ОЕФ/усл.ед., для каждой пробирки j стрипа по формуле (4).

$$K_{\text{меры}B_j} = \frac{I_{\text{ЭТ},B}}{\Delta I_{\text{меры}B_j}}, \quad (4)$$

где $I_{\text{ЭТ},B}$ – значение интенсивности флуоресценции для меры В (значение из свидетельства о поверке рабочего эталона), ОЕФ.

5.3.2.9 Разместить меру, действительное значение которой максимально приближено к началу диапазона измерений анализатора 0,01 ОЕФ, (далее – мера А) объемом 50 мкл в каждую из восьми низкопрофильных пробирок стрипа.

5.3.2.10 Произвести пятикратное измерение интенсивности флуоресценции (см. Приложение Б) меры А на длине волны возбуждения 470 нм и длиной волны эмиссии 514 нм.

5.3.2.11 По результатам измерений рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции меры А для каждой пробирки стрипа по формуле (2).

5.3.2.12 Рассчитать действительное значение интенсивности флуоресценции меры А, $\Delta I_{\text{меры}A_j}$, усл.ед., для каждой пробирки стрипа за вычетом фона по формуле (3).

5.3.2.13 Рассчитать значение интенсивности флуоресценции для меры А для каждой пробирки стрипа по формуле (5).

$$I_{\text{меры}A_j} = K_{\text{меры}B_j} \cdot \Delta I_{\text{меры}A_j}, \quad (5)$$

где $K_{\text{меры}B_j}$ – коэффициент градуировки, рассчитанный в соответствии с п. 5.3.2.8, ОЕФ/усл.ед.

5.3.2.14 Рассчитать среднее арифметическое значение восьми значений интенсивности флуоресценции $\overline{I_{\text{меры}A}}$, ОЕФ, по формуле (6).

$$\overline{I_{\text{меры}A}} = \frac{\sum_{j=1}^n I_{\text{меры}A_j}}{8}. \quad (6)$$

5.3.2.15 Рассчитать среднее квадратическое отклонение среднего арифметического результата измерений интенсивности флуоресценции $\Delta \overline{I_{\text{меры}A}}$, %, меры А по формуле (7).

$$\Delta \overline{I_{\text{меры}A}} = \frac{1}{\overline{I_{\text{меры}A}}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (I_{\text{меры}A_j} - \overline{I_{\text{меры}A}})^2}{n \cdot (n-1)}} \cdot 100. \quad (7)$$

5.3.2.16 Рассчитать случайную составляющую погрешности $\varepsilon_{\text{меры}A}$, %, величины интенсивности флуоресценции по формуле (8).

$$\varepsilon_{\text{меры}A} = t \cdot \Delta \overline{I_{\text{меры}A}}, \quad (8)$$

где t – коэффициент Стьюдента равный 2,365.

5.3.2.17 Рассчитать неисключенную систематическую составляющую погрешности, %, (далее – НСП) измерений интенсивности флуоресценции по формуле (9).

$$\Theta_{\Sigma} = |\Theta_{\text{КМФ}} + \Theta_{\text{Д}}|, \quad (9)$$

где $\Theta_{\text{КМФ}}$ – значение относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции рабочего эталона, в соответствии со свидетельством о поверке на данное средство измерений, %,

$\Theta_{\text{Д}}$ – значение относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального дозатора механического одноканального ВЮНИТ, в соответствии со свидетельством о поверке на данное средство измерений, %.

5.3.2.18 Рассчитать среднее квадратическое отклонение НСП по формуле (10).

$$I_{\Theta} = \frac{\Theta_{\Sigma}}{\sqrt{3}}. \quad (10)$$

5.3.2.19 Рассчитать суммарное среднее квадратическое отклонение оценки интенсивности флуоресценции, %, по формуле (11).

$$I_{\Sigma_{\text{меры}A}} = \sqrt{I_{\Theta}^2 + \Delta \overline{I_{\text{меры}A}}^2}. \quad (11)$$

5.3.2.20 Относительная погрешность измерений интенсивности флуоресценции вычисляются по формуле (12).

$$\Delta_{\text{меры}A} = K_{\text{НСП}_{\text{меры}A}} \cdot I_{\Sigma_{\text{меры}A}}, \quad (12)$$

где $K_{\text{НСП}_{\text{меры}A}}$ – коэффициент, определяющийся по эмпирической формуле ниже:

$$K_{\text{НСП}_{\text{меры}A}} = \frac{\varepsilon_{\text{меры}A} + \Theta_{\Sigma}}{\Delta I_{\text{меры}A} + I_{\Sigma_{\text{меры}A}}}.$$

5.3.2.21 Повторить п.п. 5.3.2.9-5.3.2.20 настоящей методики поверки с использованием меры, действительное значение которой максимально приближено к концу диапазона измерений прибора, 15,00 ОЕФ, (далее – мера С).

5.3.2.22 За относительную погрешность измерений интенсивности флуоресценции анализатора принимают наибольшее из значений, полученных в соответствии 5.3.2.20.

5.3.2.23 Анализатор считается прошедшим операцию поверки, если значение относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции не превышает $\pm 17\%$.

6 Оформление результатов поверки

6.1 Результаты поверки заносятся в протокол поверки, который хранится в организации, проводившей поверку (см. Приложение А к настоящей методике поверки).

6.2 Если анализатор прошел поверку с положительным результатом, он признаётся годным и допускается к применению.

6.2.1 Результаты поверки оформляются свидетельством о поверке в соответствии с требованиями Приказа Минпромторга России от 02.07.2015 № 1815 «Об утверждении Порядка проведения поверки средств измерений, требования к знаку поверки и содержанию свидетельства о поверке (с изменениями на 28 декабря 2018 года)».

6.3 Если анализатор прошел поверку с отрицательным результатом, он признается непригодным, не допускается к применению; на него выдается извещение о непригодности в соответствии с требованиями Приказа Минпромторга России от 02.07.2015 № 1815 «Об утверждении Порядка проведения поверки средств измерений, требования к знаку поверки и содержанию свидетельства о поверке (с изменениями на 28 декабря 2018 года)».

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(рекомендуемое)

к Методике поверки № МП 058.Д4-19

«Анализаторы автоматические для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени
LightCycler 96 Instrument с принадлежностями»**ПРОТОКОЛ**

Первичной/периодической поверки от « ____ » _____ 20 ____ года

Средство измерений: «Анализатор автоматический для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени LightCycler 96 Instrument с принадлежностями»

Наименование СИ, тип (если в состав СИ входят несколько автономных блоков)
Заводской № _____ №/№ _____

Принадлежащее _____ Номер бланка свидетельства

Наименование юридического лица, ИНН, КПП
Поверено в МП 058.Д4-19 «Анализаторы автоматические для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени LightCycler 96 Instrument с принадлежностями», утвержденной ФГУП «ВНИИОФИ» 13 февраля 2020 г.
соответствии с методикой поверкиНаименование документа на поверку, кем утвержден (согласован), дата
С применением эталонов: _____

(наименование, заводской №, разряд, класс точности или погрешность)

При следующих значениях влияющих факторов:

Температура, °С _____

Влажность, % _____

Давление, мм рт.ст. _____

(приводят перечень и значения влияющих факторов, нормированных в методике поверки)

Внешний осмотр: _____

Опробование: _____

(приводят номер ПО)

Получены результаты проверки метрологических характеристик:

Таблица А.1 – Таблица измерений интенсивности флуоресценции дистиллированной воды

№п/п	1	2	3	4	5	6	7	8
Дист. вода	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	$I_{дист.ер}$							

Таблица А.2 – Таблица измерений интенсивности флуоресценции меры В, расчёт коэффициента градуировки

№п/п	1	2	3	4	5	6	7	8
Мера В	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	I_{cp}							
	ΔI							
	K							

Таблица А.3 – Таблица измерений интенсивности флуоресценции меры А и меры С

№п/п	1	2	3	4	5	6	7	8
Мера А	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	I_{cp}							
	ΔI							
	$I_{мерыА}$							
	\bar{I}							
	$\Delta \bar{I}$							
	ε							
	Θ_{Σ}							
	I_{Θ}							
	I_{Σ}							
	K_{HCP}							
	Δ							

Продолжение таблицы А.3

№п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	№п/п	
Мера С	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	$I_{ср}$									
	ΔI									
	$I_{мерыС}$									
	\bar{I}									
	$\Delta \bar{I}$									
	ε									
	Θ_{Σ}									
	I_{Θ}									
	I_{Σ}									
	$K_{нсп}$									
Δ										

Таблица А.4 - Относительная погрешность измерений интенсивности флуоресценции

	Наибольшее расчетное значение Δ , %	Требования ТД и ОТ
Относительная погрешность измерений интенсивности флуоресценции		$\pm 17\%$.

Рекомендации:

Средство измерений признать пригодным (или непригодным) для применения

Исполнители

Подписи, Ф.И.О., должность

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(рекомендуемое)

к Методике поверки № МП 058.Д4-19

«Анализаторы автоматические для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени
LightCycler 96 Instrument с принадлежностями»

Программа LightCycler 96 устанавливается на ПК. Установочная программа находится на флеш-карте, которая входит в комплект поставки к анализатору.

Для каждого цикла измерений нужно создать свой отдельный эксперимент, инструкция по созданию которых приведена ниже.

Б.1 В навигаторе запуска выберите «Create New Experiment» (рисунок Б.1).

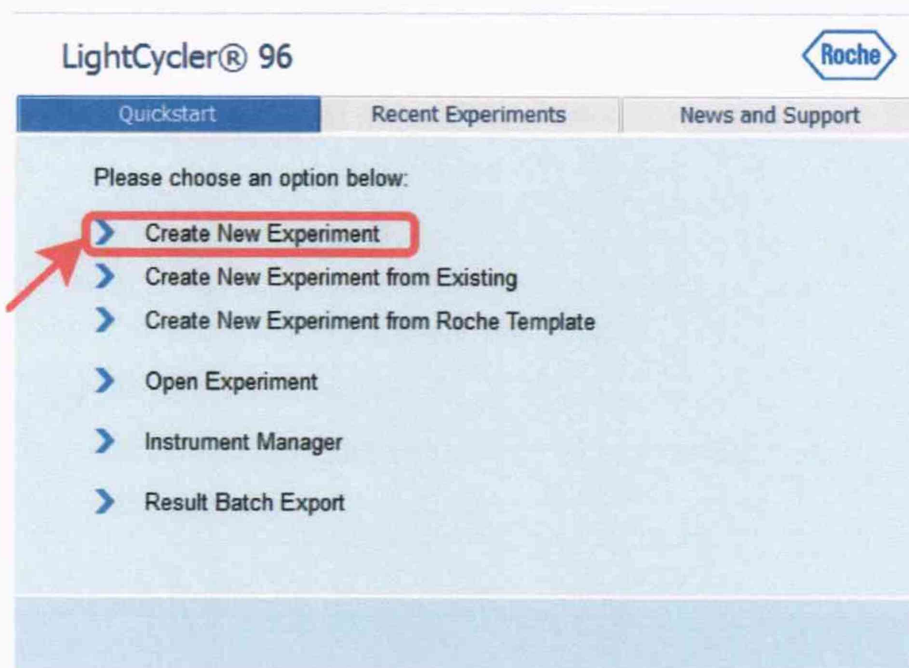


Рисунок Б.1 – Визуализация п. Б.1

Б.2 Рабочая программа LightCycler 96 откроет новый эксперимент (измерений) в основном окне (рисунок Б.2). Новый эксперимент (измерение) по умолчанию получит имя «New Experiment дата создания время создания».

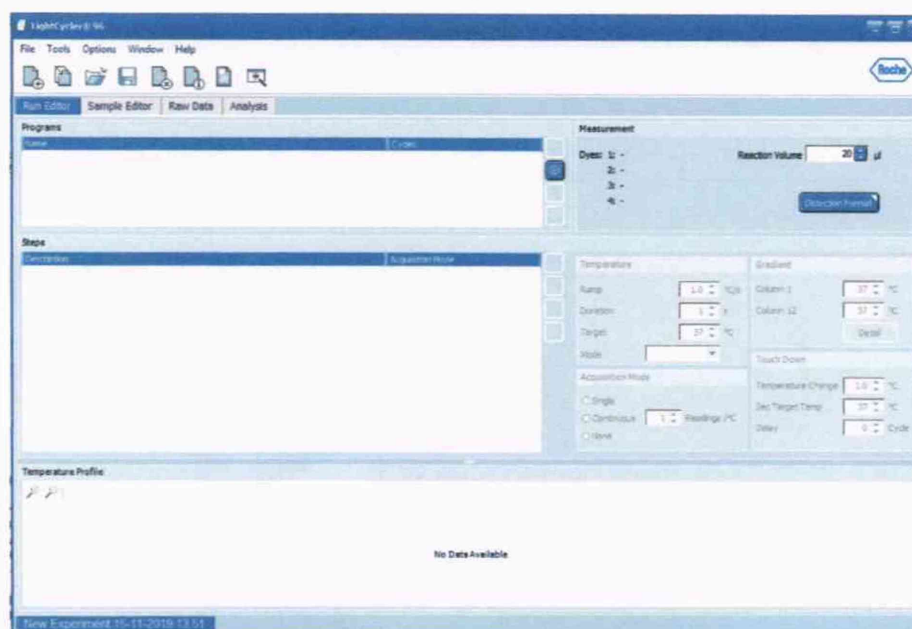



Рисунок Б.2 – Визуализация п. Б.2

Б.3 В основной вкладке «Run Editor» в окне «Programs» нажать кнопку , чтобы открыть диалоговое окно «Predefined Programs» (рисунок Б.3).

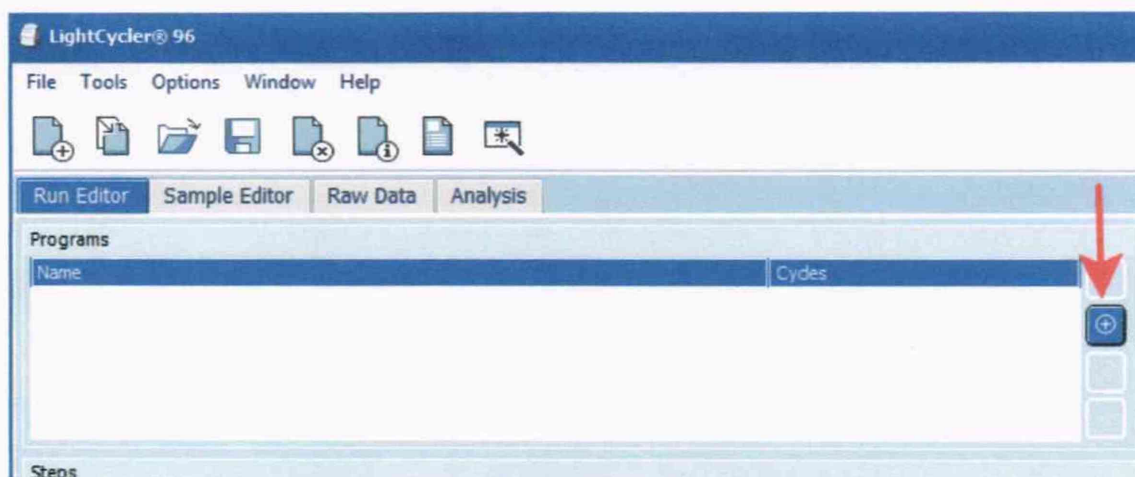


Рисунок Б.3 – Визуализация п. Б.3

Б.4 В диалоговом окне «Predefined Programs» выбрать программу «3 Step Amplification», затем нажать кнопку «Add» и выйти из данного окна кнопкой «Close» (рисунок Б.4).

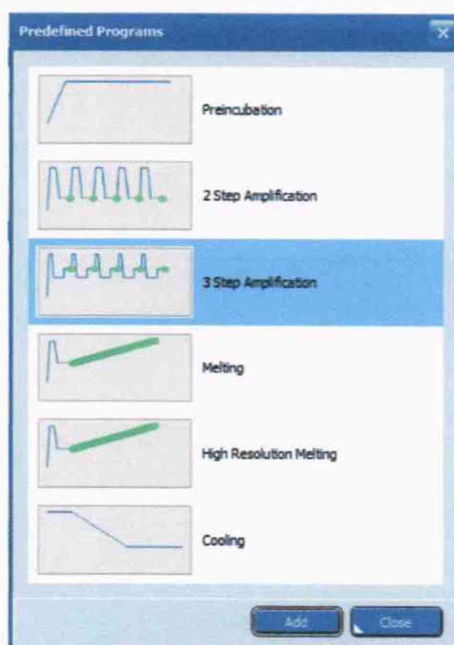


Рисунок Б.4 – Визуализация п. Б.4

Б.5 В окне «Programs» установить количество циклов в столбце «Cycles», равное 5 (рисунок Б.5).

В окне «Measurement» во вкладке «Reaction Volume» установить объем образца равный 50 мкл.

Б.6 В окне «Steps» выбрать последовательно каждый из шагов и настроить следующие параметры в окне «Temperature»:

- «Duration» – «1 s»
- «Target» – «37 °C»
- «Mode» – «Standard».

Для первого и третьего шага установить «Ramp» равный «4.4 °C/s», для второго шага – «2.2 °C/s». Для третьего шага в окне «Acquisition Mode» выбрать «Single», для первого и второго шага выбрать «None».

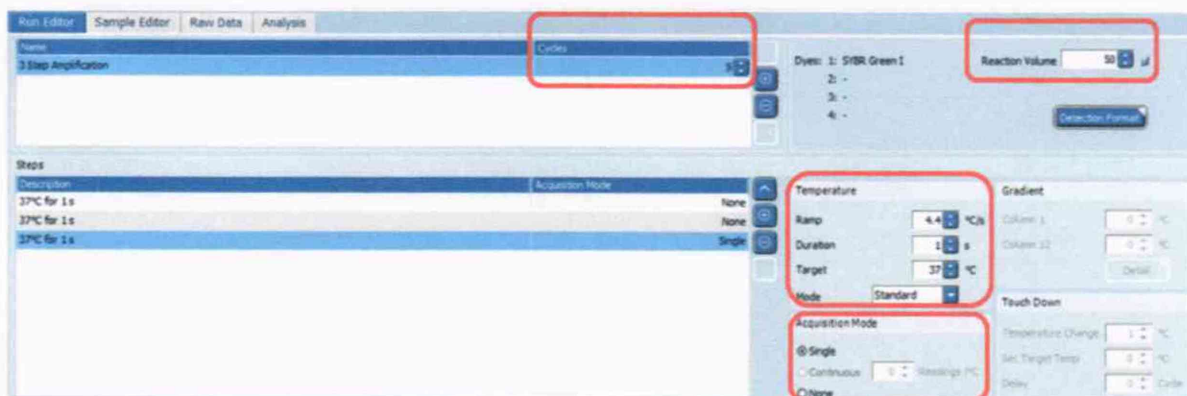


Рисунок Б.5 – Визуализация п. Б.5, Б.6

Б.7 Для выбора длины волны возбуждения и длины волны эмиссии в окне «Measurement» нажать на кнопку «Detection Format». Поставить галочку напротив строчки «SYBR Green I», затем выбрать время интеграции «Manual», нажать «ОК» (рисунок Б.6).

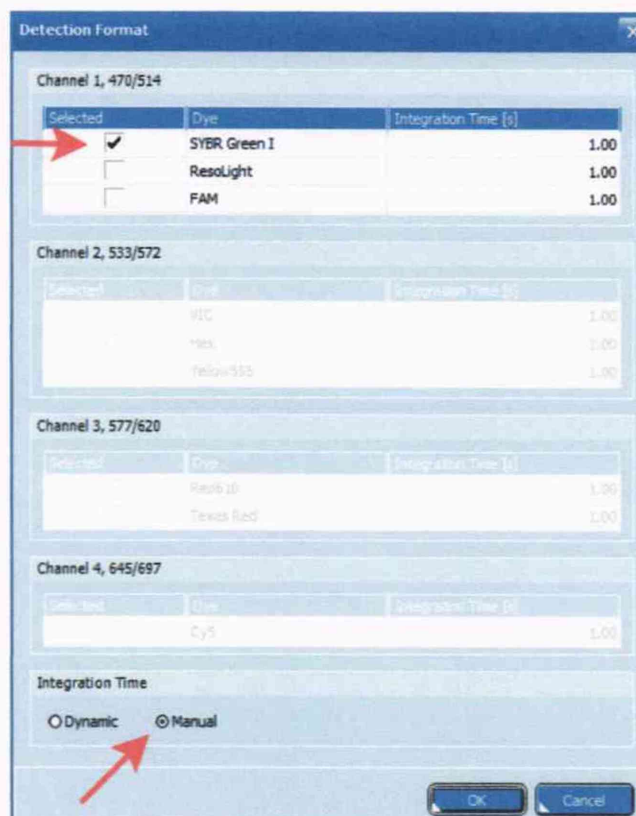



Рисунок Б.6 – Визуализация п. Б.7

Б.8 Затем необходимо сохранить введенный протокол (параметры измерений) на компьютере. Для этого:

Б.8.1 На панели инструментов нажать значок  (рисунок Б.7).

Б.8.2 В появившемся окне указать путь сохранения файла с протоколом эксперимента (параметрами измерений) и нажать кнопку «Save» (рисунок Б.7).

Примечание – стандартно файл сохраняется в следующей папке: «C:\Users\имя пользователя\documents\LightCycler 96».

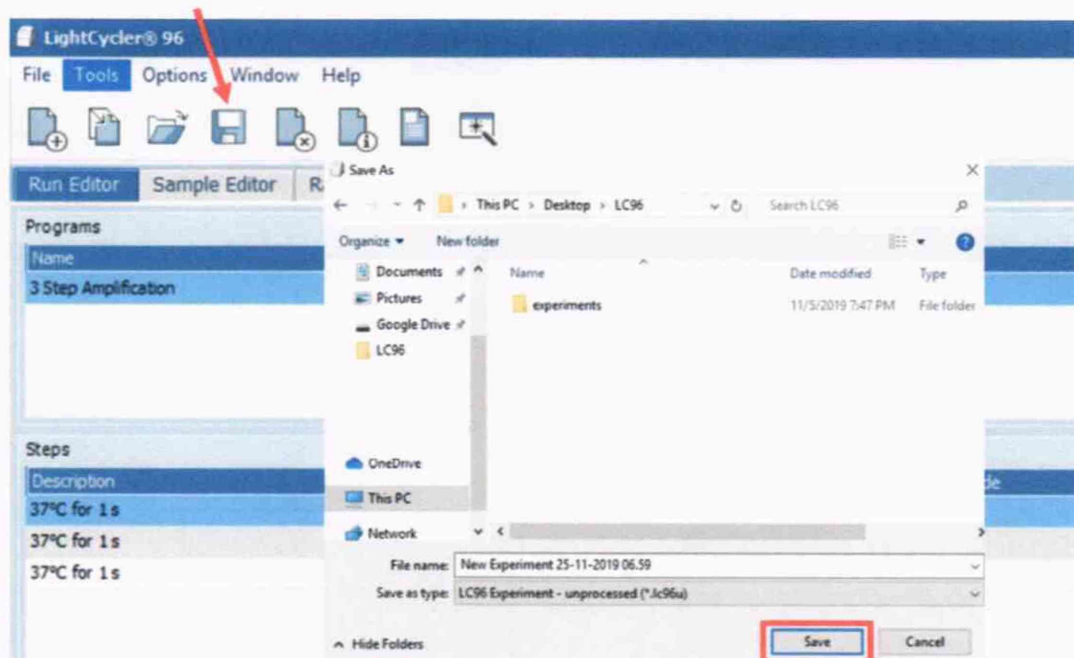



Рисунок Б.7 – Визуализация п. Б.8.1 и Б.8.2

Б.9 Для создания протокола эксперимента (параметров измерений) для дистиллированной воды, меры А, меры В и меры С нажать значок  на панели инструментов и повторить п. Б.2-Б.8 (рисунок Б.8).

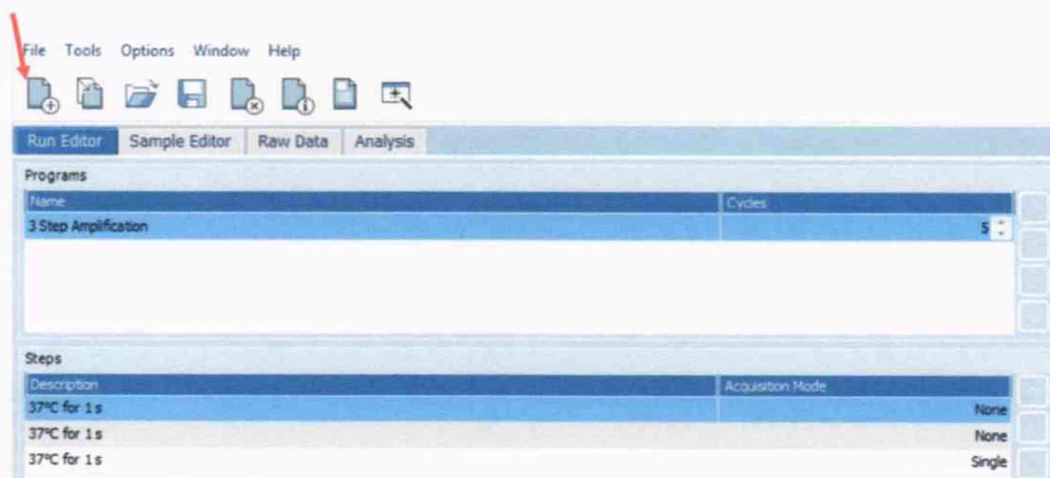


Рисунок Б.8 – Визуализация п. Б.9

Б.10 До запуска экспериментов (измерений) необходимо перенести протоколы (параметры) из п. Б.9 в анализатор. Для этого нужно произвести следующие действия:

Б.10.1 Вставить USB носитель в порт USB на ПК.



Б.10.2 Открыть Windows Explorer «C:\Users\имя пользователя\documents\LightCycler 96» и найти файлы с протоколами экспериментов (параметрами измерений).





Б.10.3 Скопировать файлы с протоколами экспериментов (параметрами измерений) (.lc96u) на USB носитель в заранее созданную папку на носителе с именем experiment.

Б.10.4 Закрыть Windows Explorer.

Б.10.5 Вытащить USB носитель из компьютера.

Б.10.6 Вставить USB носитель в порт USB на анализаторе, расположенный на правой панели анализатора.

Как только значок USB  появится на панели состояния программы анализатора, файлы с протоколами экспериментов (параметрами измерений) будут добавлены в таблицу экспериментов во вкладке «Overview». В соответствующем столбце Storage появится значок USB  (рисунок Б.9).

Б.10.7 Для переноса протоколов экспериментов (параметров измерений) с USB носителя на анализатор нужно нажать последовательно на каждый эксперимент (измерение), выделив его при этом синим цветом, а затем на кнопку «Synchronize» (рисунок Б.9). При этом значок USB  в соответствующих столбцах Storage поменяется на значок . После этого USB носитель можно удалить из анализатора, значок  в соответствующих столбцах Storage поменяется на значок .

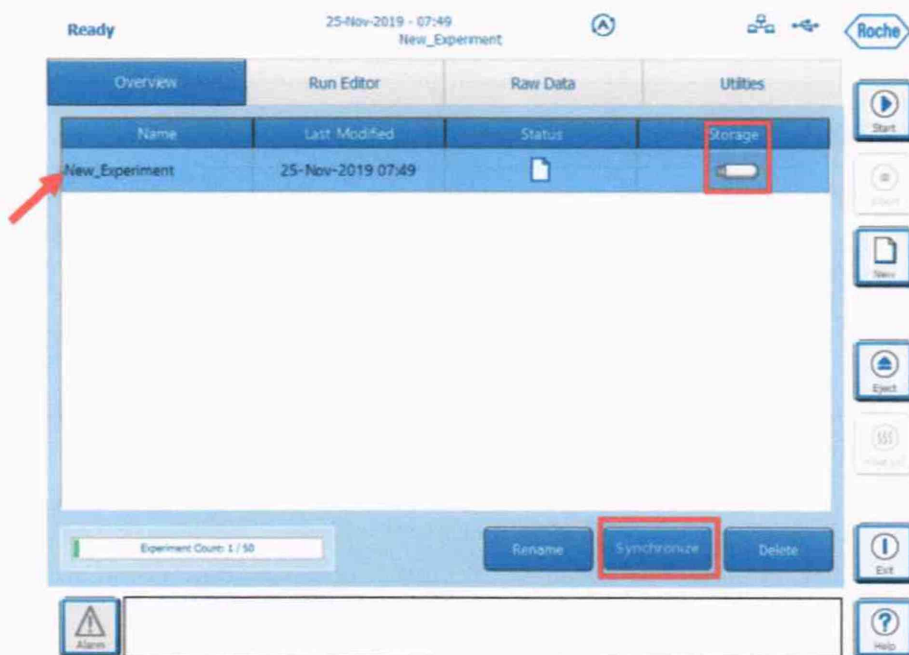


Рисунок Б.9 – Визуализация п. Б.10.6 и п. Б.10.7

Б.11 Перед запуском каждого протокола эксперимента (измерений) необходимо поместить соответствующие восемь низкопрофильных пробирок стрипа в термоблок анализатора в ячейки A1-H1 (рисунок Б.10).

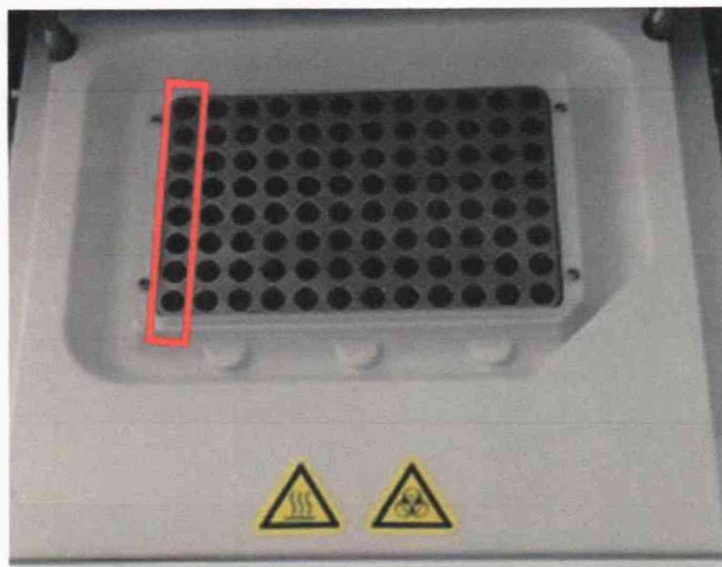


Рисунок Б.10 – Визуализация п. Б.11

Для этого необходимо:

Б.11.1 Нажать кнопку «Eject» на дисплее анализатора, которая открывает термоблок анализатора (рисунок Б.11).

Б.11.2 После внесения пробирок стрипа в соответствующие лунки слегка надавить на термоблок анализатора для его автоматического закрытия.

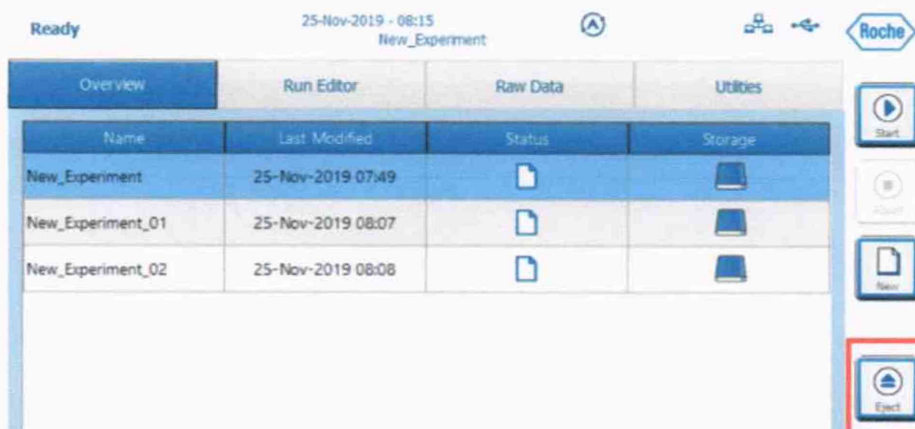


Рисунок Б.11 – Визуализация п. Б.11.1

Б.12 Для запуска протоколов экспериментов для проведения измерений нужно:

Б.12.1 Выбрать интересующий Вас эксперимент (измерение), выделив его синим цветом, и нажать на дисплее анализатора кнопку «Start» (рисунок Б.12).

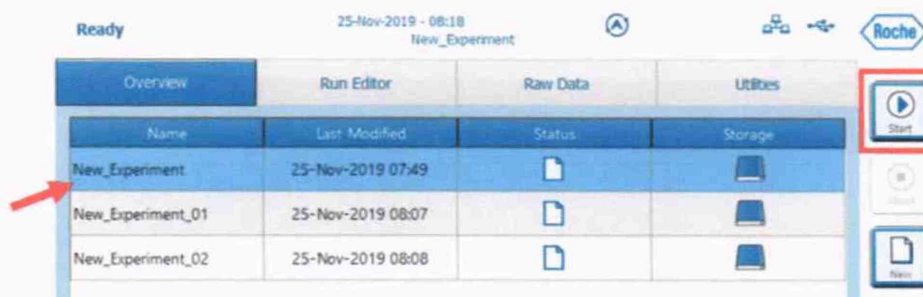


Рисунок Б.12 – Визуализация п. Б.12.1

Б.12.2 После запуска эксперимента (измерения) на дисплее анализатора автоматически открывается вкладка «Raw Data», в которой отображаются результаты эксперимента (измерений) в реальном времени (рисунок Б.13).

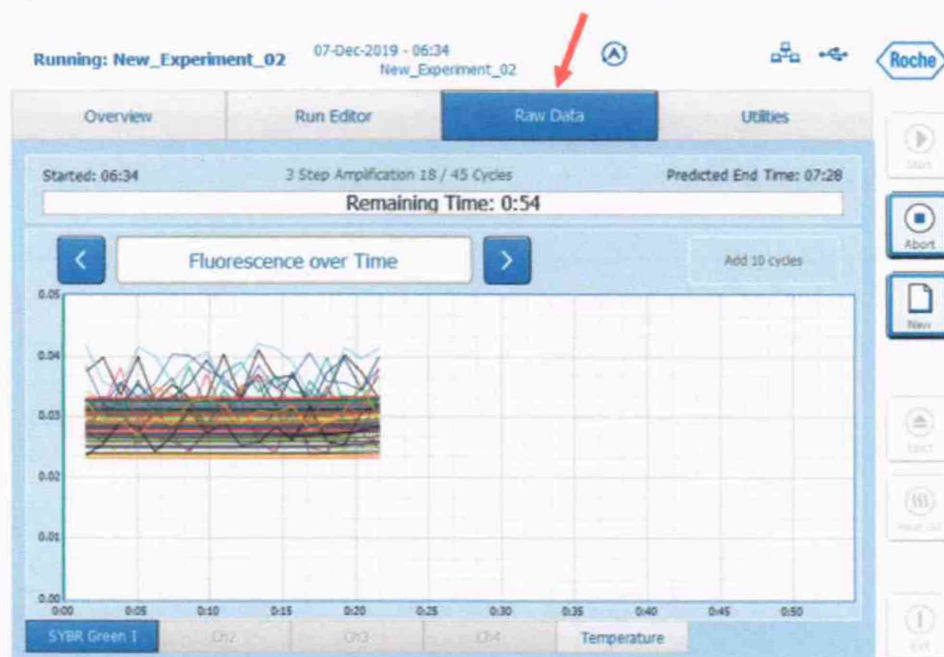




Рисунок Б.13 – Визуализация п. Б.12.2

Б.12.3 Для запуска каждого следующего эксперимента (измерений) необходимо открыть термоблок анализатора, как описано в п. Б.11, вынуть восемь использованных низкопрофильных пробирок стрипа и заменить их на пробирки стрипа, соответствующие следующему эксперименту (измерению). Затем нажать на вкладку «Overview» на дисплее анализатора и повторить п. Б.12.2.

Б.13 После запуска всех экспериментов (измерений) во вкладке «Overview» значок в графе «Status» для каждого эксперимента (измерений) поменяется с  на , что свидетельствует о запуске и завершении эксперимента (измерения) (рисунок Б.14).








Name	Last Modified	Status	Storage
New_Experiment	07-Dec-2019 06:02		
New_Experiment_01	07-Dec-2019 06:29		
New_Experiment_02	07-Dec-2019 06:34		

Рисунок Б.14 – Визуализация п. Б.13


Б.14 Затем необходимо перенести данные с анализатора на компьютер. Для этого:

Б.14.1 Вставить USB носитель в порт USB на анализаторе, расположенный на правой панели анализатора.

Б.14.2 Перенести эксперименты (результаты измерений) с анализатора на USB носитель. Для этого нужно нажать последовательно на каждый эксперимент (измерение), выделив его синим цветом, а затем на кнопку «Synchronize». При этом значок  в

соответствующих столбцах «Storage» поменяется на значок . После этого USB носитель можно удалить из анализатора.

Б.14.3 Вставить USB носитель в порт USB на ПК.

Б.14.4 В программе LightCycler® 96, установленной на компьютере, на панели инструментов нажать значок  и в открывшемся окне выбрать соответствующий эксперимент (измерение) из папки experiment на USB носителе и нажать кнопку «Open» (рисунок Б.15).

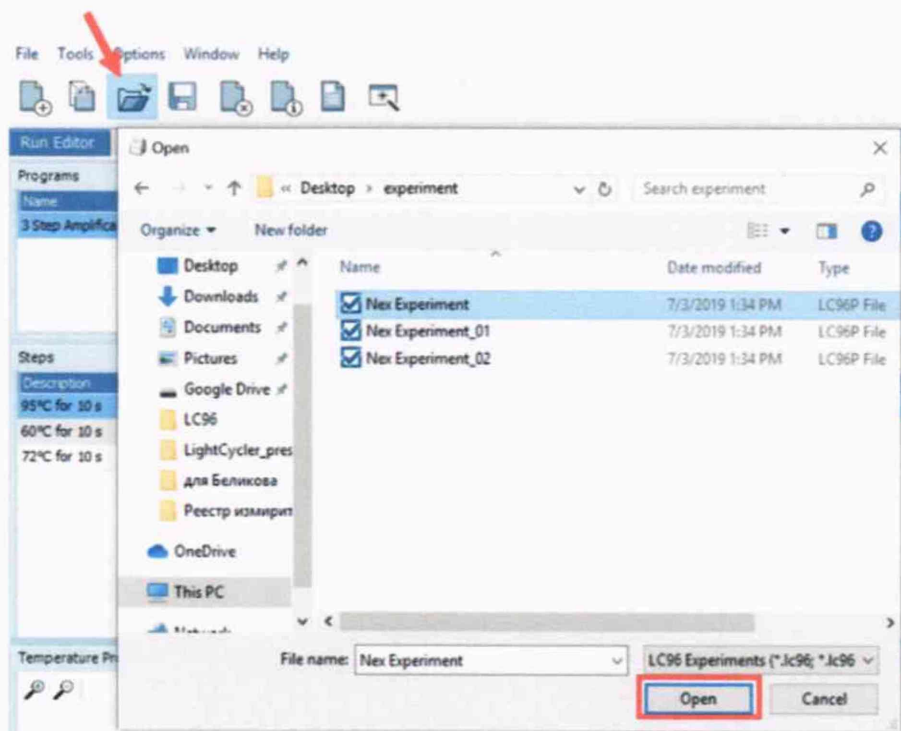


Рисунок Б.15 – Визуализация п. Б.14.4

Б.15 Для получения результатов измерения необходимо:

Б.15.1 В открывшемся эксперименте (измерении) выбрать вкладку «Sample Editor» (рисунок Б.16).

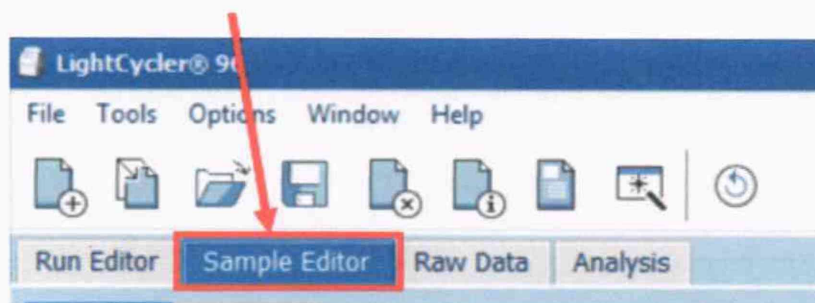


Рисунок Б.16 – Визуализация п. Б.15.1

Б.15.2 Во вкладке «Sample Editor» выбрать пустые ячейки (в которых не были помещены восемь низкопрофильных пробирок стрипов с пробами) и нажать кнопку «Clear Wells» (рисунок Б.17). При этом все удаленные ячейки станут белыми.

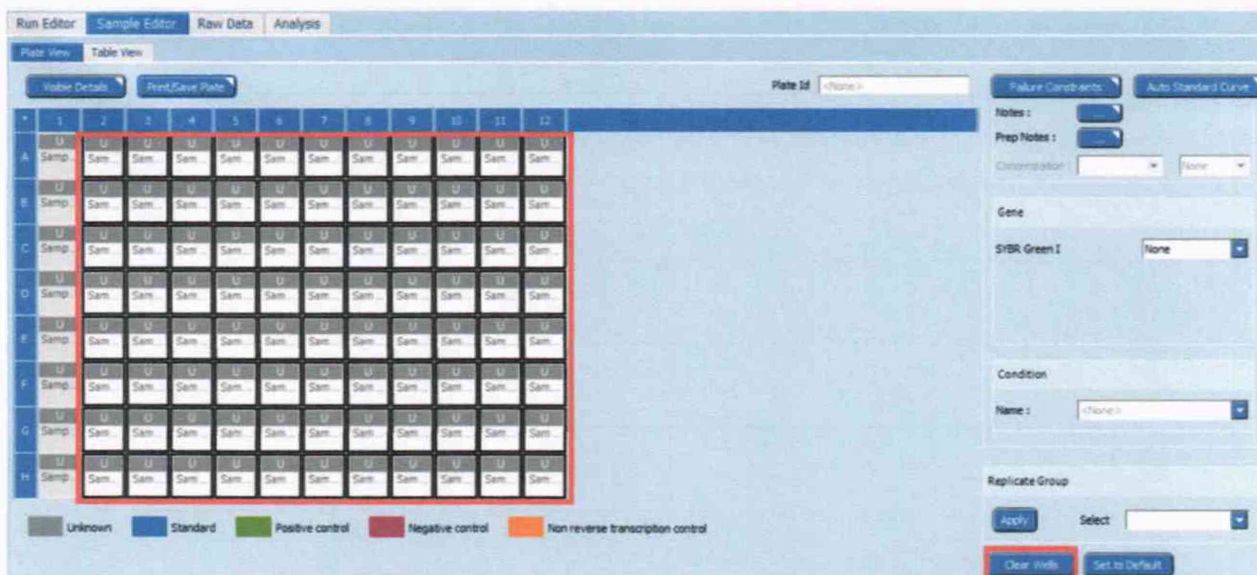


Рисунок Б.17 – Визуализация п. Б.15.2

Б.15.3 Перейти во вкладку «Raw Data» и кликнуть правой кнопкой мыши на любую область графика зависимости флуоресценции от времени, расположенном в левом верхнем углу экрана. В появившемся окне выбрать «Export», затем «As Text File» и далее «Sample as Rows» (рисунок Б.18). В появившемся окне выбираем путь сохранения файла (.txt) и нажимаем кнопку «Save».

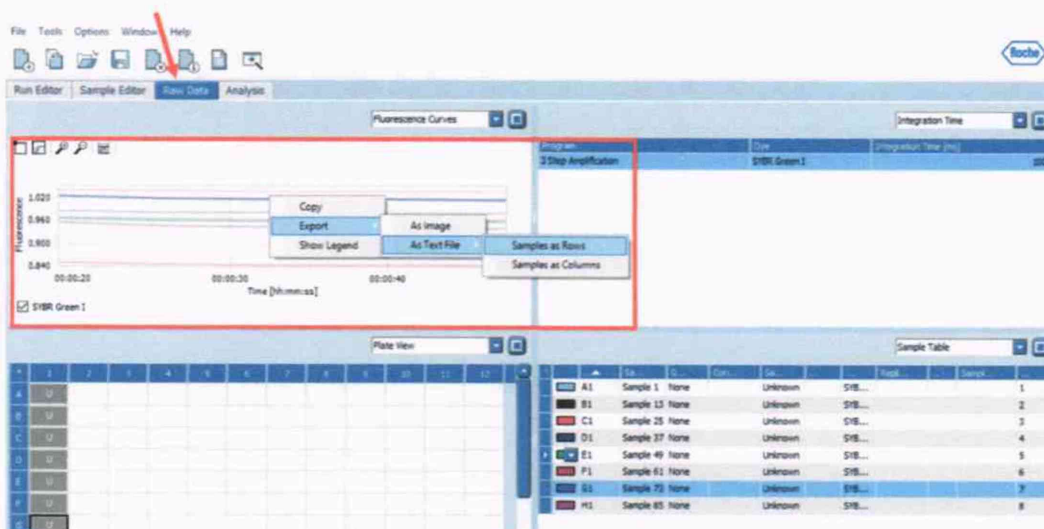


Рисунок Б.18 – Визуализация п. Б.15.3

Б.15.4 Открываем сохраненный файл с данными в формате .txt. Пять значений интенсивности флуоресценции, полученные от пятикратного измерения, для пробы, расположенной в соответствующей ячейке термоблока, представлены в рядах по горизонтали (рисунок Б.19).

File Edit Format View Help

Fluorescence\Time [hh:mm:ss] 00:00:19 00:00:26 00:00:33 00:00:40

A1 SYBR Green I	0.968528	0.962514	0.959114	0.957432	0.957014
B1 SYBR Green I	0.955749	0.947538	0.944213	0.941871	0.94101
C1 SYBR Green I	1.04233	1.03822	1.03729	1.0365	1.03586
D1 SYBR Green I	0.987638	0.983137	0.98176	0.980435	0.979956
E1 SYBR Green I	0.966003	0.962021	0.961042	0.960226	0.959935
F1 SYBR Green I	0.851966	0.845685	0.844105	0.843727	0.844337
G1 SYBR Green I	1.02514	1.01862	1.01749	1.01636	1.01599
H1 SYBR Green I	0.969556	0.96584	0.96494	0.964007	0.963582

Рисунок Б.19 – Визуализация п. Б.15.4