

Заместитель директора
ФГУП «ВНИИОФИ»

2022 г.



Методика поверки»

Главный метролог
ФГУП «ВНИИОФИ»

«18» *августа* 2022 г.

«15» августа 2022 г.

Москва
2022 г.

1 Общие положения

Настоящая методика поверки распространяется на Амплификаторы нуклеиновых кислот термоциклические автоматические с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени FLUORITE ® (далее – амплификаторы), предназначенные для измерений интенсивности флуоресценции при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологических образцах и устанавливает порядок, методы и средства проведения первичной и периодических поверок.

По итогам проведения поверки должна обеспечиваться прослеживаемость к Государственному первичному эталону единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе спектральных методов (ГЭТ 196-2015) согласно 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», утвержденной Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 3455 от 30 декабря 2019 г. Поверка амплификаторов выполняется методом прямых измерений.

Метрологические характеристики амплификаторов указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Метрологические характеристики

Наименование характеристики	Значение
Диапазон измерений интенсивности флуоресценции, ОЕФ	от 0,01 до 15,00
Пределы допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции, %, не более	± 17

2 Перечень операций поверки средства измерений

2.1 При проведении первичной и периодической поверок должны быть выполнены операции, указанные в таблице 2.

Таблица 2 – Операции поверки

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер раздела (пункта) методики поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
Внешний осмотр средства измерений	Да	Да	7
Подготовка к поверке и опробование средства измерений	Да	Да	8
Проверка программного обеспечения средства измерений	Да	Да	9
Определение метрологических характеристик средства измерений			10

Проверка диапазона измерений интенсивности флуоресценции, определение относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции	Да	Да	10.1
Подтверждение соответствия метрологическим требованиям	Да	Да	11

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

2.3 Поверку средства измерений осуществляют аккредитованные в области обеспечения единства измерений юридические лица и индивидуальные предприниматели.

3 Требования к условиям проведения поверки

3.1 При проведении поверки следует соблюдать следующие условия:

- температура воздуха от 15 до 25 °С;
- относительная влажность воздуха, не конденсирующаяся, от 20 до 85 %;
- атмосферное давление от 80,0 до 106,0 кПа.

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

4 Требования к специалистам, осуществляющим поверку

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 амплификаторы.

5 Метрологические и технические требования к средствам поверки

5.1 При проведении первичной и периодической поверок применяются средства поверки, указанные в таблице 3.

Таблица 3 – Средства поверки

Операция поверки, требующая применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
п.8 Подготовка к поверке и опробование средства измерений	Средства измерений температуры окружающей среды в диапазоне от 15 до 25 °С с абсолютной погрешностью не более 0,2 °С; Средства измерений относительной влажности воздуха в диапазоне от 30 до 80 % с абсолютной погрешностью не более 2 %; Средства измерений атмосферного давления в диапазоне от 84 до 106 кПа с абсолютной погрешностью не более 0,13 кПа	Измеритель параметров микроклимата «Метеоскоп-М», рег. № 32014-11

п. 10 Определение метрологических характеристик	Рабочий эталон по государственной поверочной схеме 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, утвержденной Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 3455 от 30 декабря 2019 г. Диапазон измерений интенсивности флуоресценции от 0,01 до 15 ОЕФ, доверительные границы относительной погрешности измерений от 3 до 5 %	Комплект мер флуоресценции КМФ-Х, рег. №79741-20
	Дозатор механический одноканальный Диапазон объемов дозирования от 10 до 100 мкл; допускаемое относительное отклонение среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального при температуре $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ от $\pm 3,0$ до $\pm 0,8$ %	Дозатор механический одноканальный ВЮНИТ рег. № 36152-12
	Низкопрофильные пробирки для ПЦР в стрипе по 8 пробирок или в 96-луночном планшете, объемом по 0,2 мл каждая (прозрачные, белые или матовые), с прозрачными крышками или покрывной пленкой ¹⁾	Низкопрофильные пробирки для ПЦР, совместимые с амплификатором FLUORITE®
	Дистиллированная вода по ГОСТ Р 58144-2018	
¹⁾ Предоставляются заявителем		

5.2 Допускается применение других средств поверки, обеспечивающих определение метрологических характеристик поверяемого средства измерений с требуемой точностью.

5.3 Допускается использовать при поверке утвержденные и аттестованные эталоны единиц величин, средства измерений утвержденного типа и поверенные, удовлетворяющие метрологическим требованиям, указанным в таблице 3.

6 Требования (условия) по обеспечению безопасности проведения поверки

6.1 При проведении поверки следует соблюдать требования, установленные ГОСТ 12.1.040-83, правилами по охране труда при эксплуатации электроустановок, указанных в приложении к приказу Министерства труда и социальной защиты РФ от 15.12.2020 № 903н. Воздух рабочей зоны должен соответствовать ГОСТ 12.1.005-88 при температуре помещения, соответствующей условиям испытаний для легких физических работ.

6.2 Помещение, в котором проводится поверка, должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

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

7 Внешний осмотр средства измерений

7.1 Проверку внешнего вида амплификатора проводят путем визуального осмотра. Проводят сравнение фотографических изображений, приведенных в описании типа на данный амплификатор и образца, представленного на поверку.

7.2 Провести визуальный осмотр амплификатора на отсутствие видимых повреждений, влияющих на его работоспособность. Убедиться в наличии маркировки с ясным указанием типа и серийного номера амплификатора.

7.3 Проверить комплектность амплификатора (без запасных частей и расходных материалов) на соответствие требованиям описания типа на данный амплификатор.

7.4 Амплификатор считают прошедшим операцию поверки, если:

- внешний вид амплификатора соответствует фотографическим изображениям из описания типа на данный амплификатор;
- корпус, внешние элементы, элементы управления и индикации не повреждены;
- комплектность соответствует разделу «Комплектность» описания типа на данный амплификатор;
- маркировка амплификатора содержит сведения о производителе, типе и серийном номере прибора.

8 Подготовка к поверке и опробование средства измерений

8.1 Подготовить поверяемый амплификатор к работе согласно его РЭ.

8.2 Опробование амплификатора включает в себя следующие операции:

- проверка выхода на рабочий режим.

8.3 Проверка выхода на рабочий режим амплификатора проводится путём включения амплификатора в соответствии с указаниями, приведёнными в руководстве по эксплуатации и прогрева в течение 30 секунд.

После прогрева амплификатора (выхода на режим) на дисплее отображается главное меню амплификатора.

8.4 Амплификатор считают прошедшим операцию поверки, если:

- амплификатор вышел на рабочий режим не позднее, чем через 30 секунд после включения.

9 Проверка программного обеспечения средства измерений

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

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

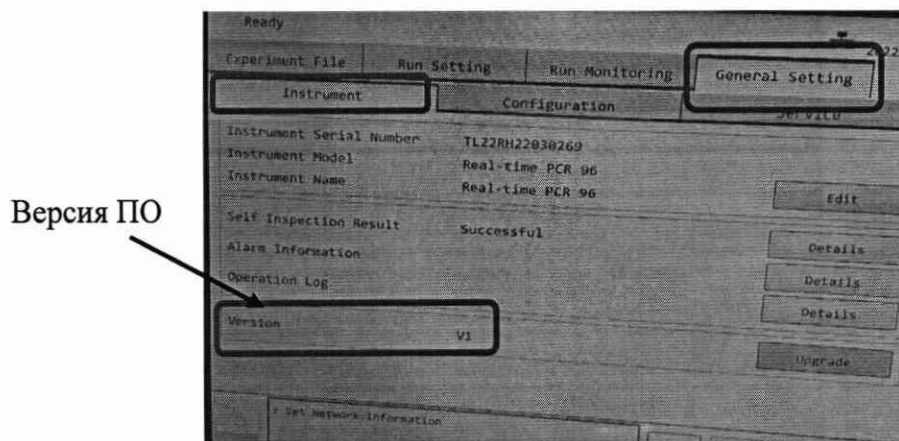


Рисунок 1 – Часть сенсорного экрана амплификатора с отображением версии ПО во вкладке «Instrument»

9.3 При использовании программного обеспечения, установленного на ПК, выбрать в верхней панели «Help» → «About» (рисунок 2). Появится отдельное информационное окно, в котором будет указана версия ПО.

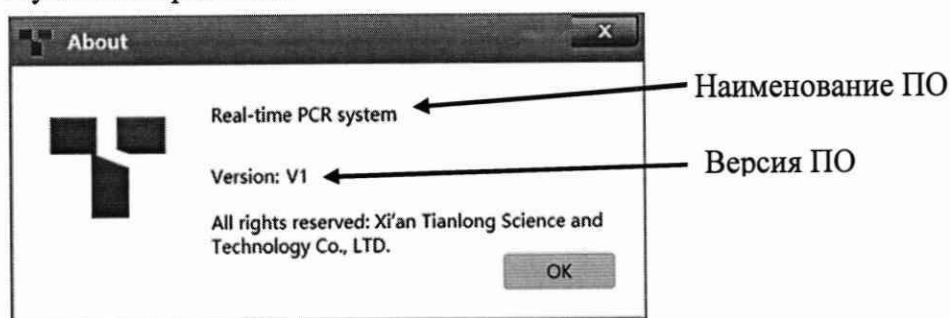


Рисунок 2 – Информационное окно ПО амплификатора с обозначением наименования и версии ПО

9.4 Амплификатор считают прошедшим операцию опробования, если версии ПО амплификатора и ПО, установленного на ПК, соответствуют значениям, приведенным в таблице 4 настоящей методики поверки.

Таблица 4 – Идентификационные данные программного обеспечения

Идентификационные данные (признаки)	Значение
Идентификационное наименование ПО	Real time pcr
Номер версии (идентификационный номер) ПО, не ниже	V1
Цифровой идентификатор ПО	-

10 Определение метрологических характеристик средства измерений

10.1 Проверка диапазона измерений интенсивности флуоресценции, определение относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции

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

10.1.1 Проверка диапазона измерений интенсивности флуоресценции.

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

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

10.1.2 Определение пределов допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции.

10.1.2.1 Подготовить по восемь низкопрофильных пробирок стрипа, содержащих дистиллированную воду, меры А, В и С соответственно. Объем каждой анализируемой пробы дистиллированной воды, мер А, В и С должен составлять 50 мкл.

Мера А представляет собой меру, действительное значение интенсивности флуоресценции которой максимально приближено к началу диапазона измерений амплификатора.

Мера В представляет собой меру, действительное значение интенсивности флуоресценции которой максимально приближено к середине диапазона измерений амплификатора.

Мера С представляет собой меру, действительное значение интенсивности флуоресценции которой максимально приближено к концу диапазона измерений амплификатора.

10.1.2.2 Произвести пятикратное измерение интенсивности флуоресценции (см. Приложение Б) дистиллированной воды, мер А, В и С на длине волны возбуждения 465 нм и длиной волны эмиссии 510 нм.

10.1.3 Провести обработку результатов измерений в соответствии с п. 11.1.

11 Подтверждение соответствия средства измерений метрологическим требованиям

11.1 Обработка результатов измерений интенсивности флуоресценции

11.1.1 Рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции дистиллированной воды, $I_{дист_{ср,j}}$, усл.ед., для каждой пробирки j стрипа по формуле

$$I_{дист_{ср,j}} = \frac{\sum_{i=1}^n I_{д_{i,j}}}{n}, \quad (1)$$

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

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

n – число измерений, равное 5.

11.1.2 Рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции меры В, $I_{мерыВ_{ср,j}}$, усл.ед., для каждой пробирки j стрипа по формуле

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

где $I_{i,j}$ – измеренное значение интенсивности флуоресценции меры, усл.ед.;

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

n – число измерений, равное 5.

11.1.3 Рассчитать действительное значение интенсивности флуоресценции меры В, $\Delta I_{мерыВ_j}$, усл.ед., для каждой пробирки стрипа за вычетом фона по формуле

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

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

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

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

11.1.5 Рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции меры А для каждой пробирки стрипа по п. 11.1.2.

11.1.6 Рассчитать действительное значение интенсивности флуоресценции меры А, $\Delta I_{\text{меры}A_j}$, усл.ед., для каждой пробирки стрипа за вычетом фона по п. 11.1.3.

11.1.7 Рассчитать значение интенсивности флуоресценции для меры А для каждой пробирки стрипа по формуле

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

где $K_{\text{меры}B_j}$ – коэффициент градуировки, рассчитанный в соответствии с п. 11.1.4, ОЕФ/усл.ед.

11.1.8 Рассчитать среднее арифметическое значение восьми значений интенсивности флуоресценции $\overline{I_{\text{меры}A}}$, ОЕФ, по формуле

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

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

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

11.1.10 Рассчитать случайную составляющую погрешности $\varepsilon_{\text{меры}A}$, %, величины интенсивности флуоресценции по формуле

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

где t – коэффициент Стьюдента равный 2,365.

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

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

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

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

11.1.12 Рассчитать среднее квадратичное отклонение НСП по формуле

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

11.1.13 Рассчитать суммарное среднее квадратическое отклонение оценки интенсивности флуоресценции, %, по формуле

$$I_{\Sigma_{мерыА}} = \sqrt{I_{\Theta}^2 + \Delta I_{мерыА}^2}. \quad (11)$$

11.1.14 Относительная погрешность измерений интенсивности флуоресценции вычисляют по формуле

$$\Delta_{мерыА} = K_{НСП_{мерыА}} \cdot I_{\Sigma_{мерыА}}, \quad (12)$$

где $K_{НСП_{мерыА}}$ – коэффициент, определяющийся по эмпирической формуле

$$K_{НСП_{мерыА}} = \frac{\varepsilon_{мерыА} + \Theta_{\Sigma}}{\Delta I_{мерыА} + I_{\Sigma_{мерыА}}}. \quad (10)$$

11.1.15 Повторить п.п. 11.1.5 – 11.1.14 для меры С.

11.2 За относительную погрешность измерений интенсивности флуоресценции амплификаторов принимают наибольшее из значений, полученных в соответствии с п. 11.1.14.

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

12 Оформление результатов поверки

12.1 Результаты поверки оформляются протоколом поверки. Рекомендуемая форма протокола поверки приведена в приложении А. Протокол может храниться на электронных носителях.

12.2 При положительных результатах поверки по запросу заказчика может быть оформлено свидетельство о поверке в установленной форме.

12.3 При отрицательных результатах поверки по запросу заказчика может быть оформлено извещение о непригодности в установленной форме с указанием причин непригодности.

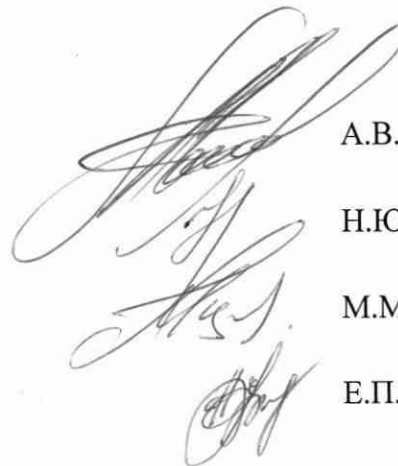
12.4 Сведения о результатах поверки передаются в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений.

Начальник отдела Д-4

Начальник сектора отдела Д-4

Ведущий научный сотрудник отдела Д-4

Ведущий инженер отдела Д-4



А.В. Иванов

Н.Ю. Грязских

М.М. Чугунова

Е.П. Полунина



ПРИЛОЖЕНИЕ А

(рекомендуемое)

к Методике поверки № МП 032.Д4-22

«Амплификаторы нуклеиновых кислот термоциклические автоматические с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени FLUORITE®»

ПРОТОКОЛ ПЕРВИЧНОЙ ПОВЕРКИ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ

Амплификаторы нуклеиновых кислот термоциклические автоматические с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени FLUORITE®

(наименование, тип СИ и модификации в соответствии с описанием типа, в единственном числе)

Заводской номер:

Год выпуска:

Изготовитель:

Владелец СИ:

Применяемые эталоны:

Применяемая методика поверки:

МП 032.Д4-22 «Амплификаторы нуклеиновых кислот термоциклические автоматические с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени FLUORITE®», согласованная ФГУП «ВНИИОФИ» «18» августа 2022 г.

Условия поверки:

- температура окружающей среды:
- относительная влажность воздуха:
- атмосферное давление:

Проведение поверки:

1. Внешний осмотр:
2. Опробование:
3. Идентификация программного обеспечения:
4. Определение метрологических характеристик:

Полученные 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							
	$I_{дист.р}$							

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}								
	$K_{НСП}$								
	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_{cp}								
	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

Метрологическая характеристика	Требования технической документации	Результат (соответствие)
Диапазон измерений интенсивности флуоресценции, ОЕФ	от 0,01 до 15,00	
Пределы допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции, %, не более	$\pm 17 \%$	

5 Заключение по результатам поверки:

Начальник отдела:

Дата поверки:

Поверитель:

Подпись

Фамилия И.О.

Подпись

Фамилия И.О.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

к Методике поверки № МП 032.Д4-22

«Амплификаторы нуклеиновых кислот термоциклические автоматические с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени FLUORITE ®»

Порядок создания параметров теста и проведения измерений интенсивности флуоресценции с помощью программного обеспечения амплификатора нуклеиновых кислот термоциклического автоматического с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени FLUORITE ®

Прикладное программное обеспечение (ПО) поставляется на USB-носителе и устанавливается на ПК для управления прибором и анализа экспериментальных данных.

Для проведения измерений нужно создать отдельный эксперимент, инструкция по созданию которого приведена ниже.

Б.1 Для запуска ПО дважды щелкните значок  на рабочем столе, чтобы запустить приложение прибора.

Б.2 После запуска ПО экран приветствия автоматически переключится на интерфейс запуска и на нем появится всплывающая панель быстрого запуска, как показано на рисунке Б.1.

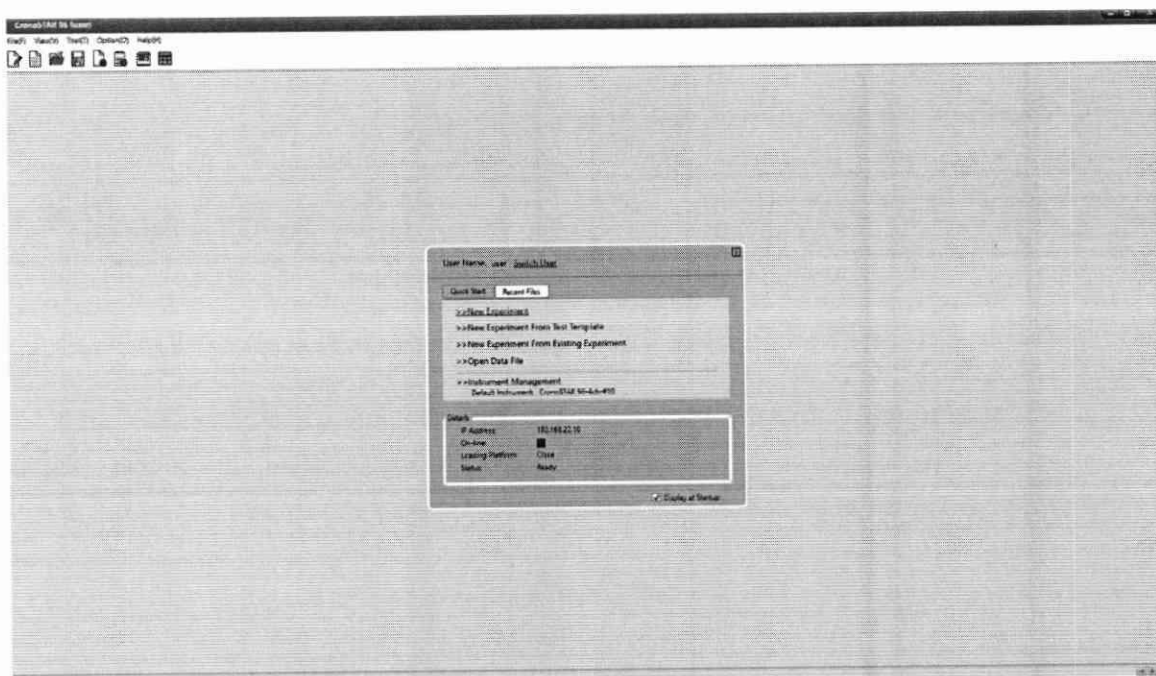


Рисунок Б.1 – Визуализация п. Б.2

Б.3 С помощью панели быстрого доступа или строки меню необходимо создать новый эксперимент. Для этого выбрать «Quick Start» → «New Experiment» в панели быстрого доступа или в строке меню главного интерфейса «File (F)» → «New Experiment» (рисунок Б.2).

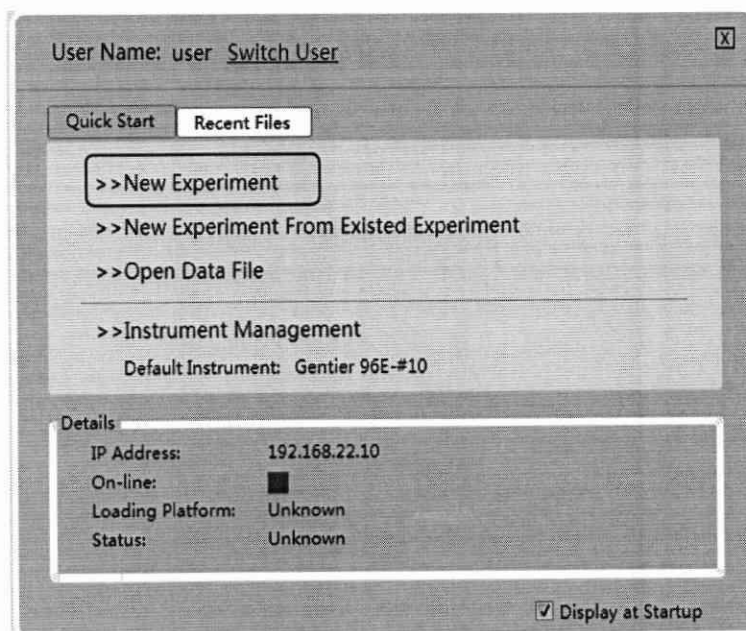


Рисунок Б.2 – Визуализация п. Б.3

Б.4 В появившемся окне необходимо задать имя эксперимента и место его хранения в окнах «Experiment Name» и «Save Path» соответственно и нажать кнопку «New» для создания и сохранения нового файла эксперимента (рисунок Б.3).

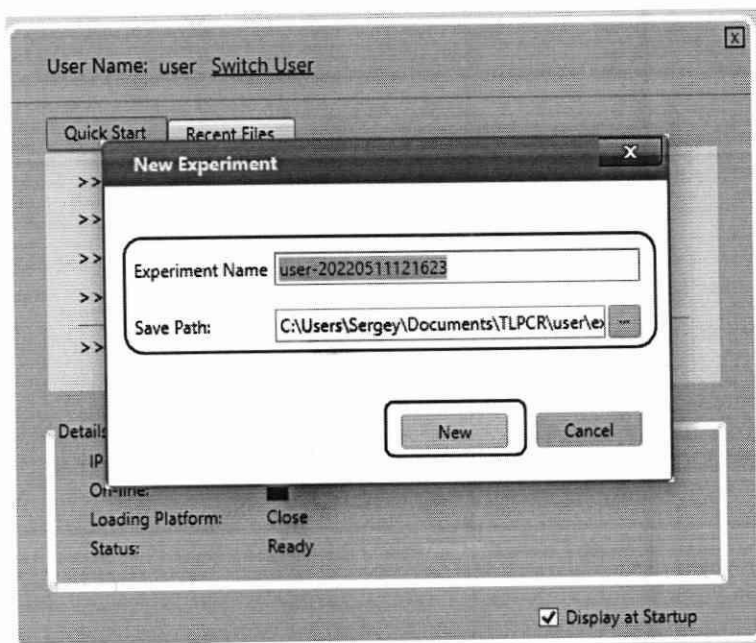


Рисунок Б.3 – Визуализация п. Б.4

Б.5 После создания нового файла эксперимента рабочая зона в главном интерфейсе ПО будет активирована, как показано на рисунке Б.4.

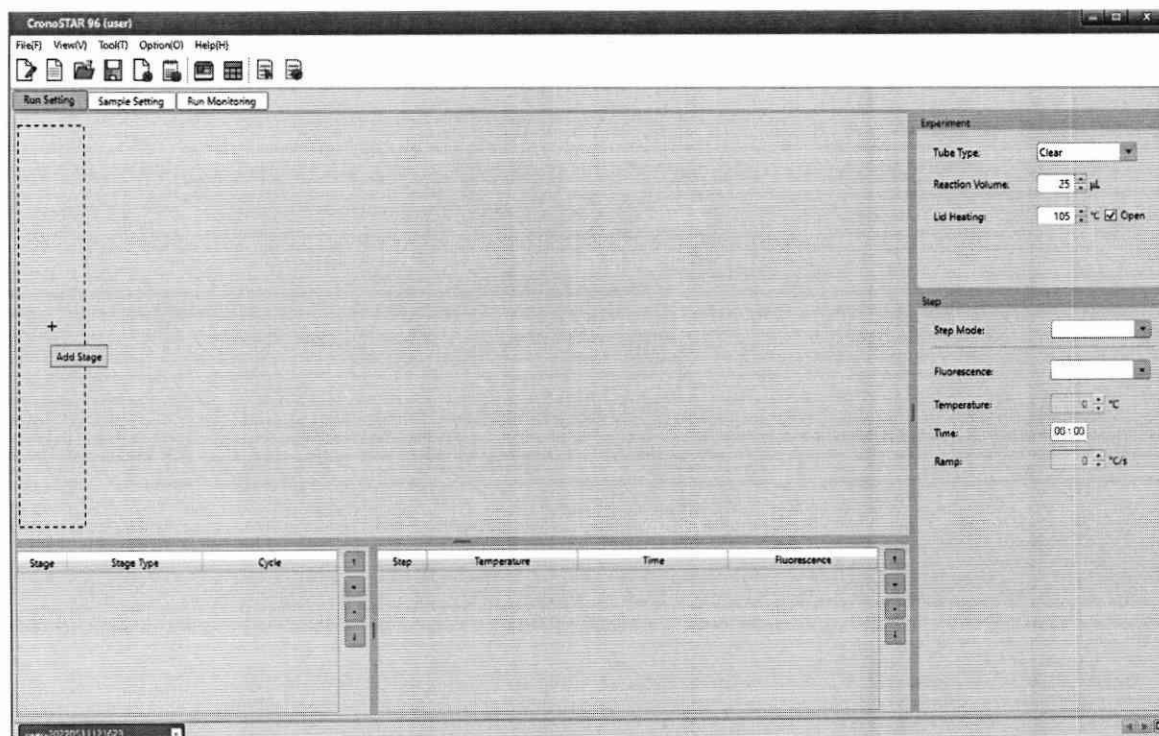


Рисунок Б.4 – Визуализация п. Б.5

Б.6 В основной вкладке «Run Setting» нажать «+ Add Stage», чтобы открыть диалоговое окно «Stage Type» (рисунок Б.5).

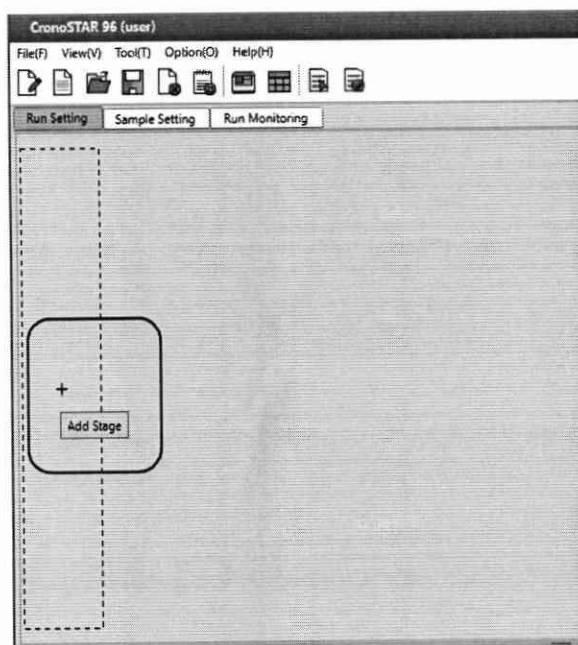


Рисунок Б.5 – Визуализация п. Б.6

Б.7 В диалоговом окне «Stage Type» выбрать программу «2 Step Amplification», затем нажать кнопку «Add» и выйти из данного окна кнопкой «Close» (рисунок Б.6).

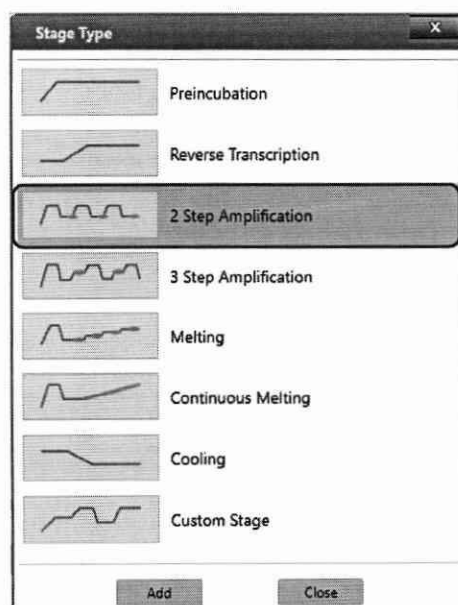


Рисунок Б.6 – Визуализация п. Б.7

Б.8 Повторить процедуру по п. Б.7 еще один раз. После чего зона температурного режима вкладки эксперимента «Run Setting» будет иметь вид как показано на рисунке Б.7.

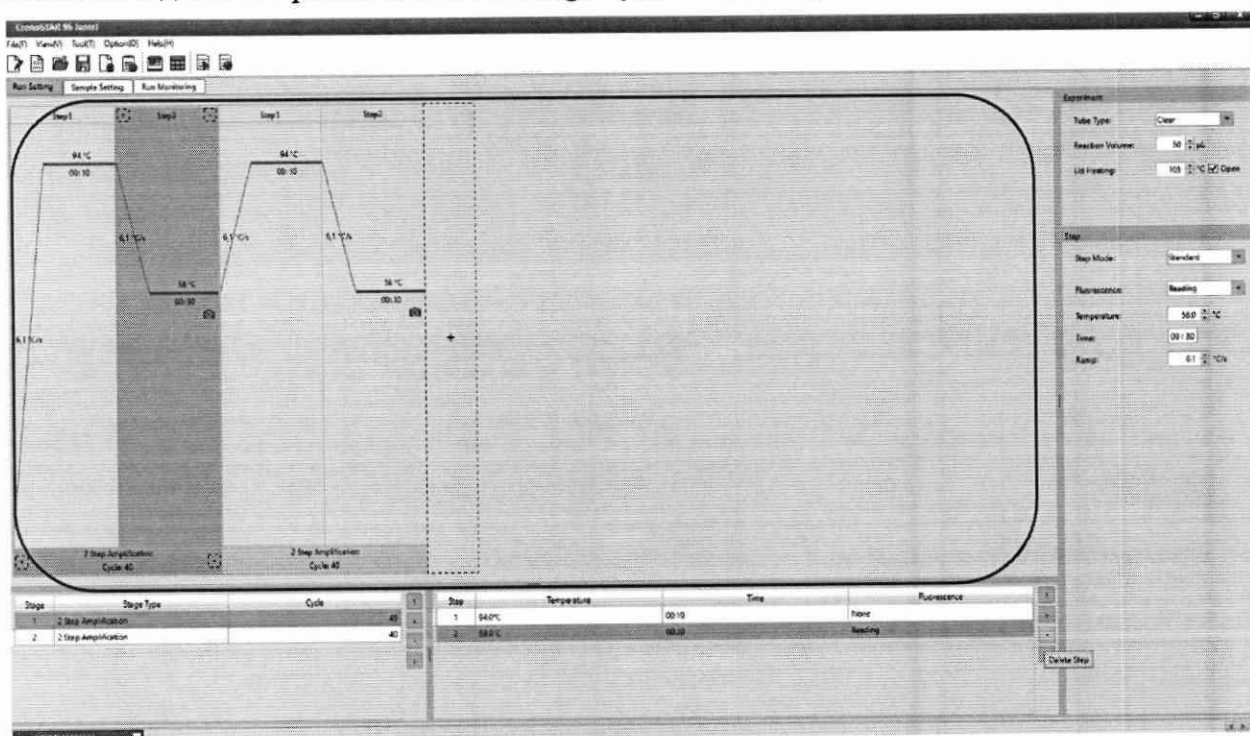


Рисунок Б.7 – Визуализация п. Б.8

Б.9 В зоне температурного режима вкладки эксперимента «Run Setting» удалить этап «Step2» для каждой ступени амплификации, для чего необходимо выделить соответствующую зону «Step2» щелчком левой кнопки мыши (она будет выделена синим цветом) и нажать значок  «Delete Stage».

Б.10 Задать параметры измерения на каждом этапе «Stage» (рисунок А.8) для этого необходимо:

Б.10.1 В окне «Stage» выбрать последовательно каждый из этапов и настроить следующие параметры:

Б.10.1.1 Для этапа 1 «Stage 1»:

- в окне «Cycle» установить количество циклов «1»;
- в окне «Step» установить: «Step Mode» - «Standard»
«Fluorescence» - «None»
«Temperature» - «37 °C»
«Time» - «00:01»
«Ramp» - «6.1 °C/s»

Б.10.1.2 Для этапа 2 «Stage 2»:

- в окне «Cycle» установить количество циклов «5»;
- в окне «Step» установить: «Step Mode» - «Standard»
«Fluorescence» - «Reading»
«Temperature» - «37 °C»
«Time» - «00:01»
«Ramp» - «6.1 °C/s»

Б.10.2 В окне «Experiment» во вкладке «Reaction Volume» для каждого этапа установить объем образца 50 мкл. Остальные параметры в этом окне заданы автоматически.

Б.10.3 По умолчанию программа настроена на использование пробирок прозрачного типа «Clear». В случае применения пробирок из белого или матового пластика необходимо выбрать соответствующий тип пробирки в окне «Experiment» → «Tube Type» → Clear (прозрачный) / White (белый) / Frosted (матовый)).

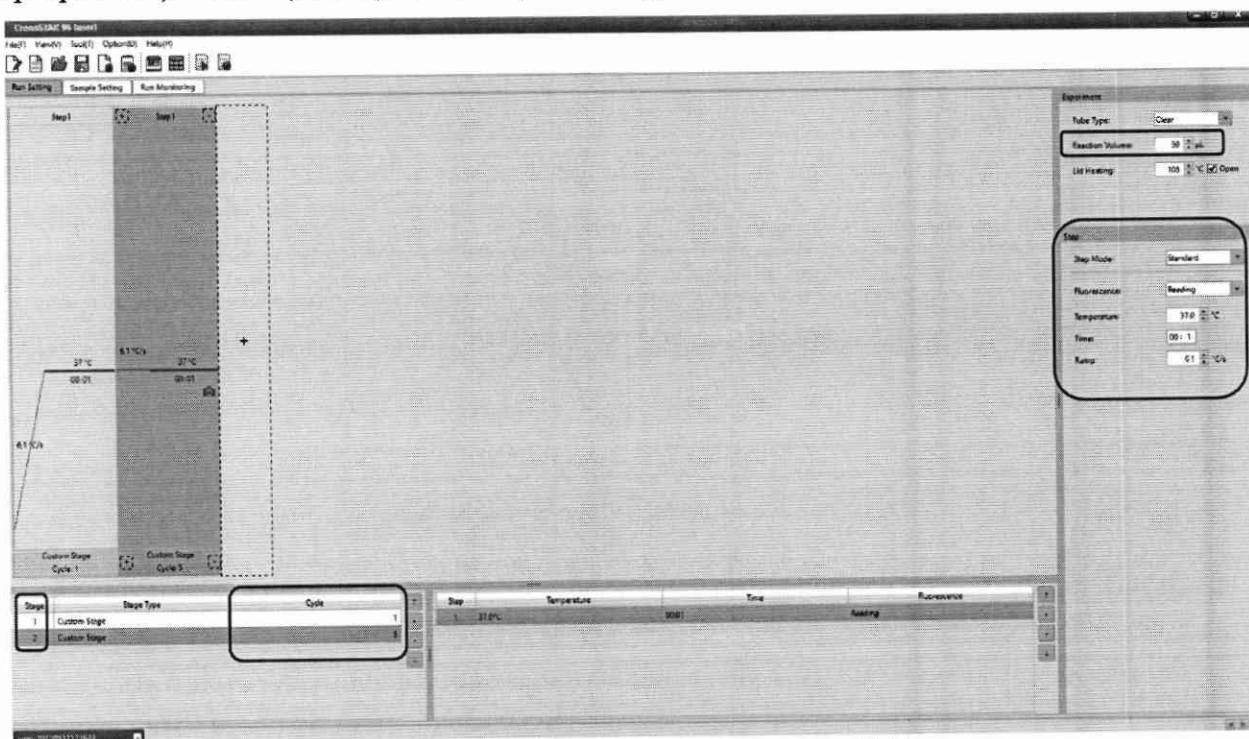


Рисунок Б.8 – Визуализация п. Б.9 – Б.10

Б.11 Во вкладке эксперимента «Sample Setting» указать заполненную образцами область блока для образцов погружной полки – нажатием левой кнопки мыши выбрать необходимую область (рисунок Б.9). В окне «Property» задать следующие параметры:

Тип образца «Sample Type» - ■ Unknown (неизвестный);

Краситель «Dye» - FAM, что соответствует требуемым значениям длины волны возбуждения и длины волны эмиссии.

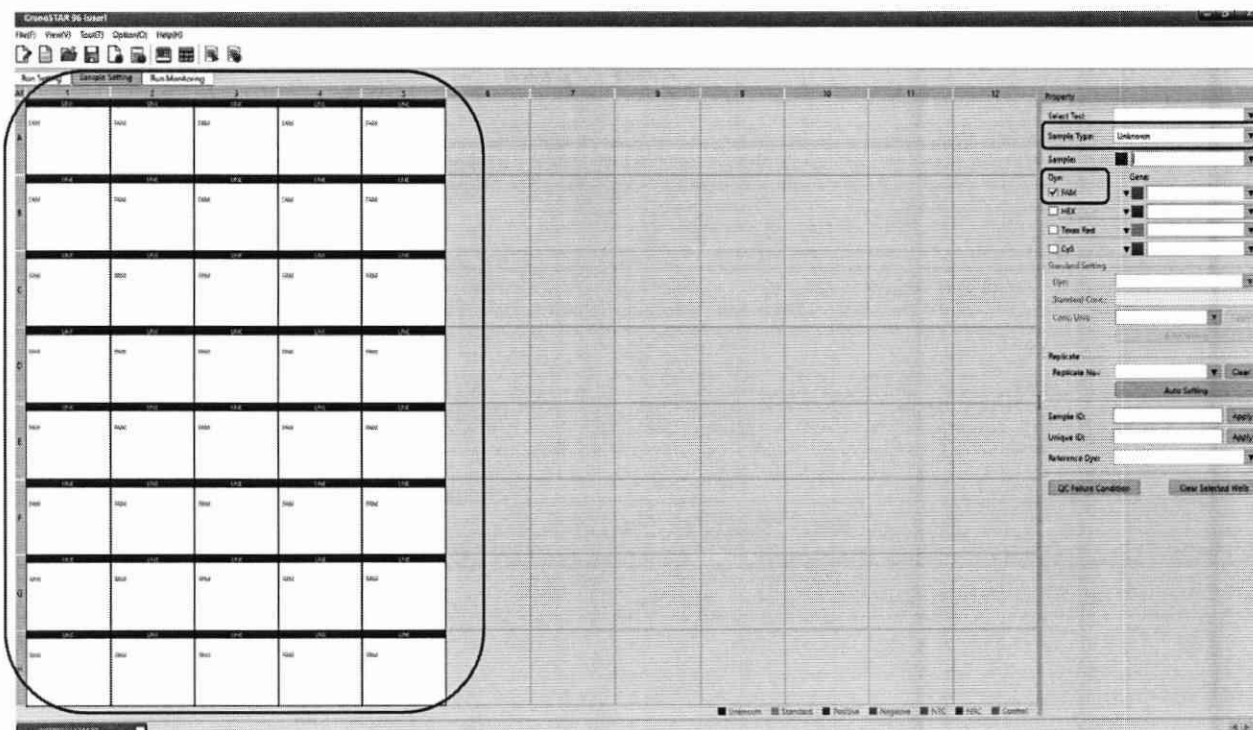


Рисунок Б.9 – Визуализация п. Б.11

Б.12 Сохранить введенные параметры измерений на компьютере. Для этого использовать строку меню главного интерфейса ПО выбрать подменю «File (F)» → «Save As» → «указать папку для сохранения на ПК» → «Сохранить».

Б.13 Поместить подготовленные стрипы с дистиллированной водой, мерами А, В и С в термоблок амплификатора (рисунок Б10). Для этого необходимо:

Б.13.1 Нажать на встроенном дисплее амплификатора значок  «Open/Close» (открыто/ закрыто).

Б.13.2 Поместить стрипы в термоблок амплификатора, нажать на встроенном дисплее амплификатора значок  «Open/Close» (открыто/ закрыто).

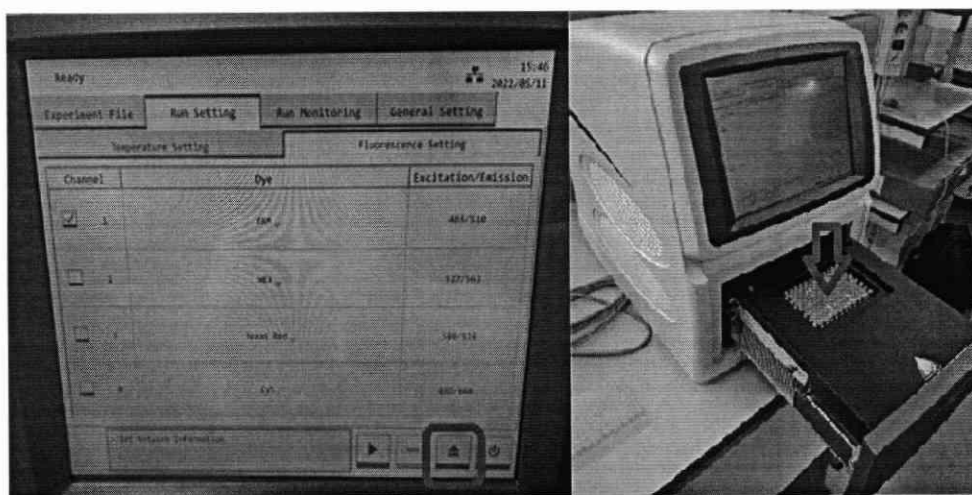


Рисунок Б.10 – Визуализация п. Б.13

Б.14 Запустить созданную программу измерений на ПК. Для этого необходимо перейти во вкладку «Run Monitoring», проверить соответствие заданных параметров измерений и нажать кнопку «Run» (рисунок Б.11)

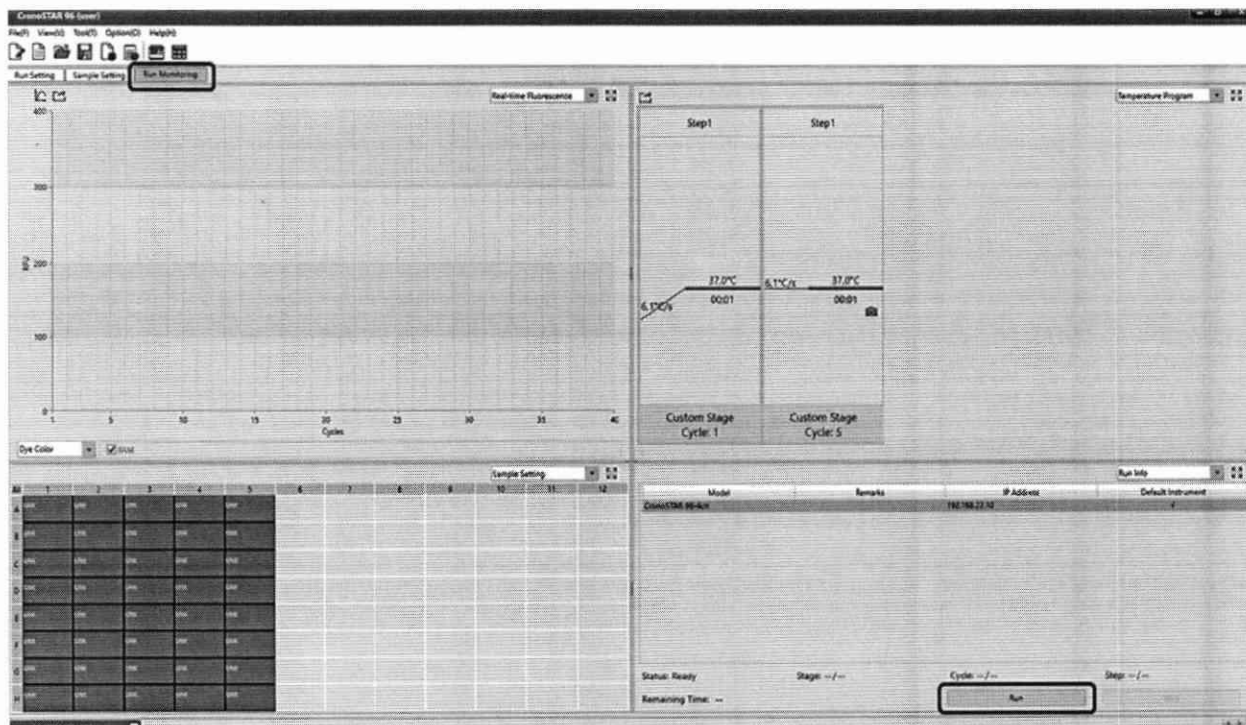


Рисунок Б.11 – Визуализация п. Б.14

Б.15 После запуска анализа в строке меню рабочей зоны появляется вкладка «Analysis», где будут отражены результаты измерений.

Б.16 Необходимо сохранить результаты измерений на ПК в заданную папку в формате Excel. Для этого необходимо:

Б.16.1 Необходимо выбрать метод анализа данных, которые нужно проанализировать для этого во вкладке «Analysis» нажать на панели инструментов значок  «New Analysis» и программа автоматически откроет диалоговое окно анализа, где необходимо (рисунок Б.12):

- поставить галочку напротив «End Point Fluorescence»;
- во вкладке «Select Stage» выбрать «Stage2»;
- во вкладке «Select Step» выбрать «Step1».
- нажать кнопку «OK».

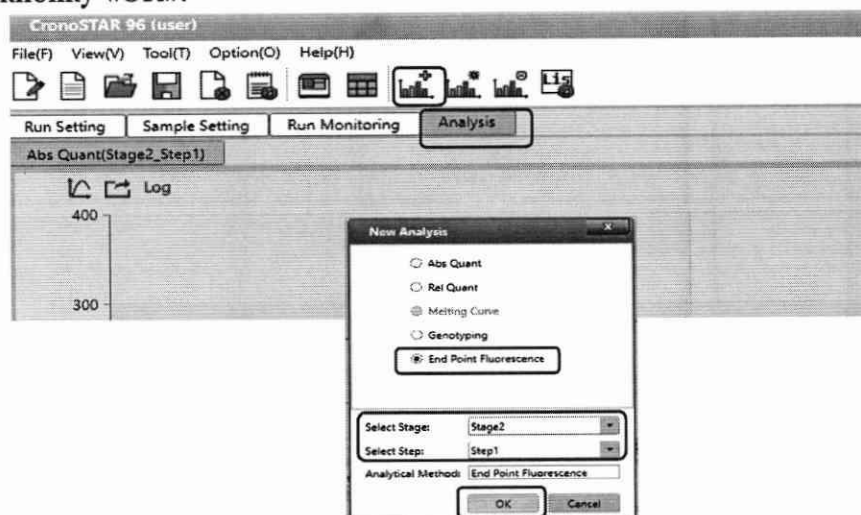


Рисунок Б.12 – Визуализация п. Б.16.1

Б.16.2 Во вкладке эксперимента «Sample Setting» выбрать пустые ячейки (в которых не были помещены восемь низкопрофильных пробирок стрипов с пробами) и нажать кнопку «Clear Selected Wells» (рисунок Б.13). При этом все удаленные ячейки станут белыми.

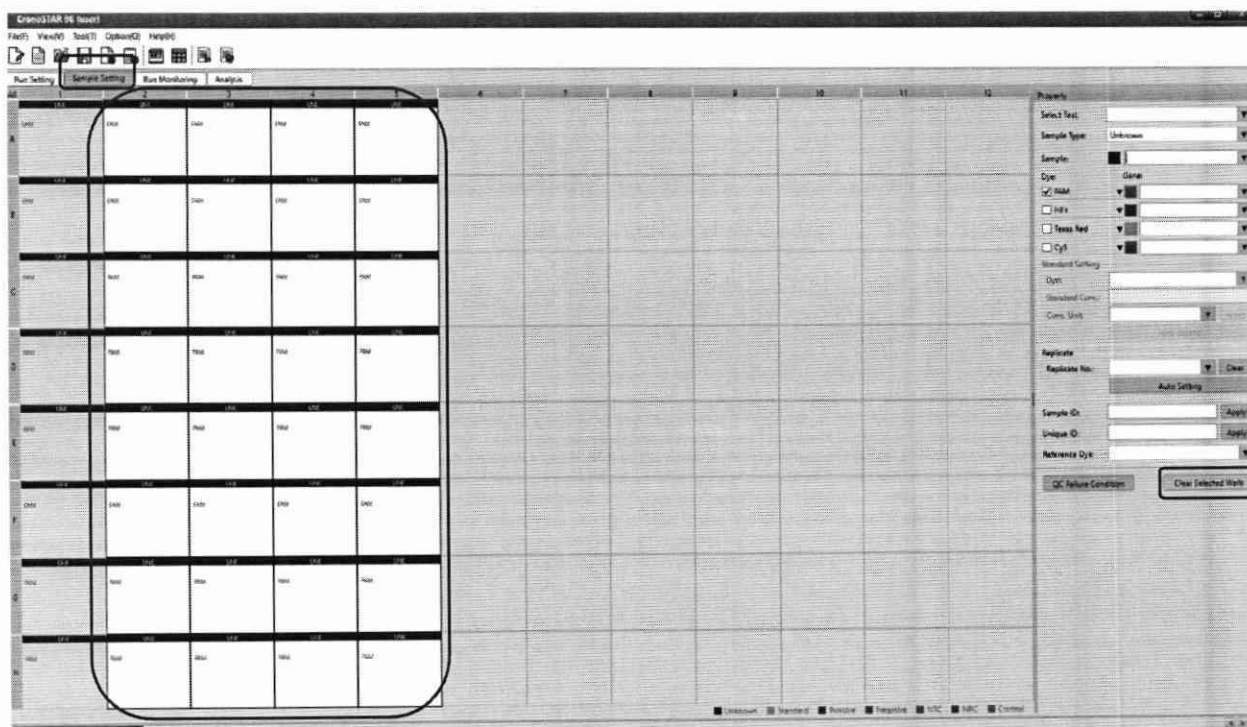


Рисунок Б.13 – Визуализация п. Б.16.2

Б.16.3 Перейти во вкладку «Analysis» → «End Point Fluorescence (Stage2_ Step1)» поставить курсор мыши в любую область графика «Amplification Curve», расположенном в левой верхней четверти экрана, в меню ПО нажать на кнопку «Export», затем выбрать необходимую папку на ПК, куда следует сохранить результаты измерений, нажать на кнопку «OK» (рисунок Б.14).

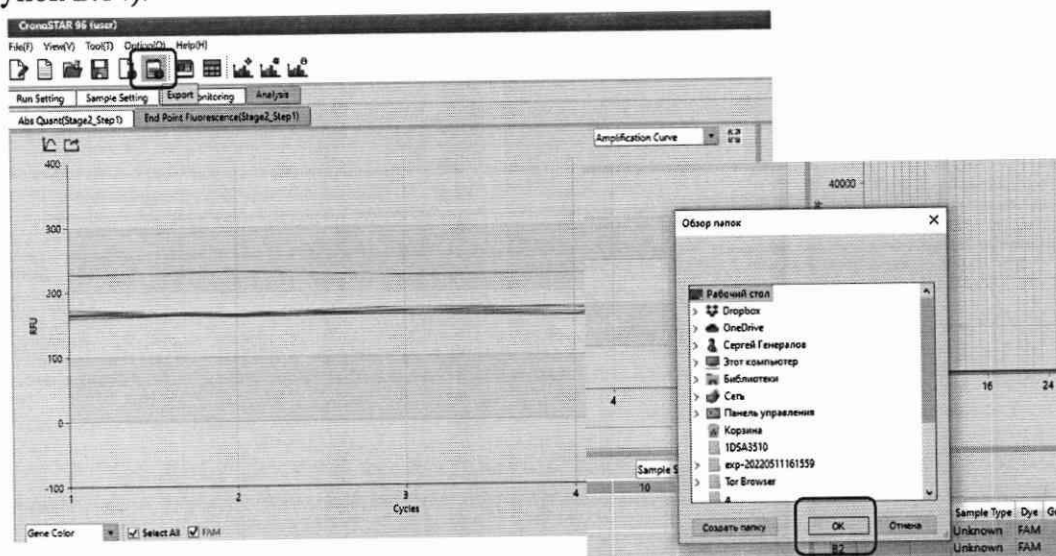


Рисунок Б.14 – Визуализация п. Б.16.3

Б.16.4 Открыть сохраненный файл с данными в формате Excel. Пять значений интенсивности флуоресценции, полученные от пятикратного измерения, для пробы, расположенной в соответствующей ячейке термоблока, представлены в рядах по вертикали (рисунок Б.15).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Cycle	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2		
2	1	55224,00	49615,00	52409,00	49504,00	45614,00	49659,00	56490,00	58328,00		
3	2	54792,00	48519,00	51665,00	48458,00	44520,00	48814,00	56328,00	58388,00		
4	3	55032,00	47772,00	51628,00	47233,00	43476,00	48105,00	56449,00	58317,00		
5	4	54282,00	45576,00	51259,00	44809,00	41513,00	46827,00	55388,00	57267,00		
6	5	53812,00	43644,00	50536,00	42898,00	39994,00	45744,00	55610,00	57470,00		
7											
8											
9											
10											

Рисунок Б15 – Визуализация п. Б.16.4

Б.17 В случае, когда амплификатор не имеет подключения к ПК необходимо перенести созданный и сохраненный на ПК файл эксперимента. Для этого необходимо (рисунок Б.16):

- подключить к ПК USB-носитель и скопировать на него сохраненный согласно п. Б.12 файл эксперимента;
- подключить USB-носитель к амплификатору с помощью USB интерфейса, расположенного на корпусе амплификатора;
- на встроенном дисплее амплификатора во вкладке «Experiment File» в строке меню

будет активен значок . Чтобы выполнить передачу файлов между USB-носителем и прибором, нажмите значок , и в раскрывающемся списке выбрать «Import Experiment (Импорт эксперимента)» и импортировать выбранный файл эксперимента с USB-носителя в систему прибора. Во вкладке «Experiment File» появится перенесенный файл эксперимента.

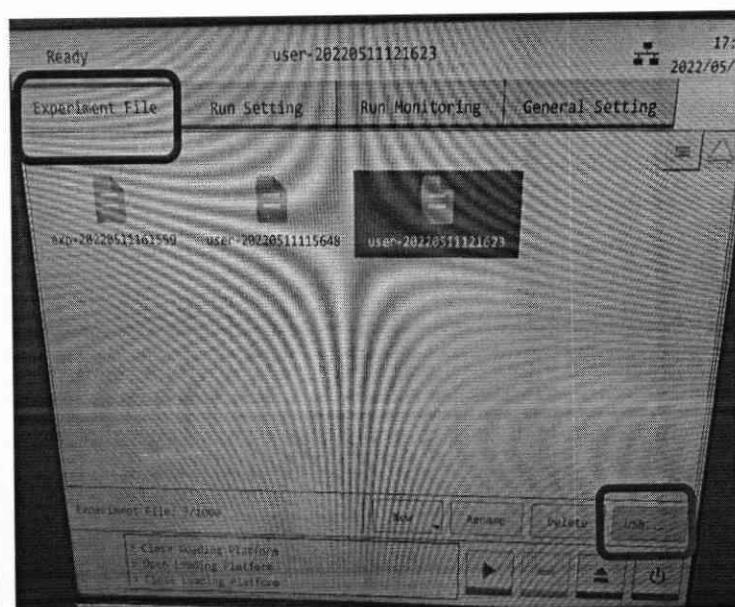


Рисунок Б.16 – Визуализация п. Б.17

Б.18 Во вкладке «Experiment File» выбрать перенесенный файл, выделив его синим цветом, и запустить его нажатием на значок  «Run Experiment (Проведение эксперимента)» (рисунок Б.17). После запуска эксперимента (измерения) на дисплее анализатора автоматически открывается вкладка «Run Monitoring», в которой отображаются результаты эксперимента (измерений) в реальном времени, а значок  «Run Experiment» меняется на значок  «Pause Experiment». По завершении эксперимента значок  «Pause Experiment» меняется обратно на значок  «Run Experiment».

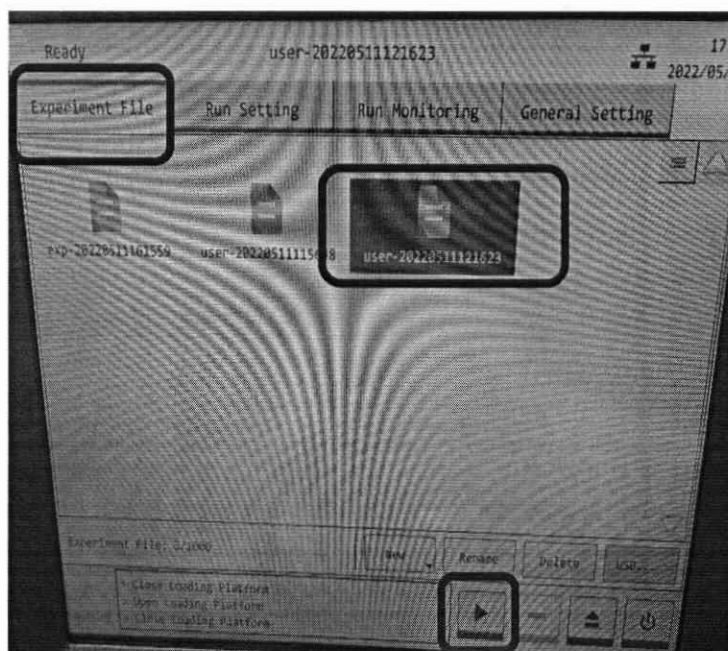


Рисунок Б.17 – Визуализация п. Б.18

Б.19 Для анализа данных эксперимента на ПК необходимо перенести результаты анализа с амплификатора на ПК и открыть их в ПО. Для этого необходимо:

- подключить USB-носитель к амплификатору с помощью USB интерфейса, расположенного на корпусе амплификатора;

- на встроенном дисплее амплификатора во вкладке «Experiment File» в строке меню

будет активен значок . Чтобы выполнить передачу файлов между прибором и USB-носителем, нажмите значок , и в раскрывающемся списке выбрать «Export Experiment (Экспорт эксперимента)» экспортировать выбранный файл эксперимента из системы прибора на USB-носитель;

- вставить USB-носитель и скопировать файл эксперимента в соответствующую папку на ПК;

- запустить через установленное на ПК ПО файл эксперимента, для чего необходимо в меню ПО выбрать «File (F)» → «Open Data File...» → «выбрать перенесенный файл данных эксперимента» → «Открыть». Результаты эксперимента сохранить в формате Excel в соответствии с п. Б.16.