



047-17 2021-07-16



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для количественного определения РНК  
вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)  
методом обратной транскрипции  
и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

## **ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ**

Регистрационное удостоверение  
№ ФСР 2008/03503 от 26 апреля 2010 года

Каталожные номера:  
Q4-P609-23/9 (пробирки)  
Q4-P609-S3/9 (стрипы)

**ВНИМАНИЕ!** Изучите инструкцию перед началом работы



## СОДЕРЖАНИЕ

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1    | НАЗНАЧЕНИЕ .....   | 4  |
| 2    | ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА .....  | 4  |
| 2.1  | Принцип метода .....   | 4  |
| 2.2  | Количество тестов .....  | 6  |
| 2.3  | Состав набора .....  | 6  |
| 2.4  | Время проведения анализа .....   | 7  |
| 3    | АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....   | 7  |
| 4    | МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....  | 8  |
| 5    | ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ .....   | 8  |
| 6    | АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ .....  | 10 |
| 6.1  | Взятие образцов периферической крови .....   | 10 |
| 6.2  | Транспортирование и хранение исследуемого материала .....  | 10 |
| 6.3  | Получение плазмы крови .....   | 10 |
| 7    | ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА .....   | 11 |
| 7.1  | Выделение РНК из плазмы крови .....  | 11 |
| 7.2  | Проведение реакции обратной транскрипции .....   | 14 |
| 7.3  | Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции .....  | 16 |
| 8    | СОЗДАНИЕ ТЕСТА (ПРОТОКОЛА) ДЛЯ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ<br>АМПЛИФИКАТОРОВ ПРИ ПЕРВОЙ ПОСТАНОВКЕ НА ДАННОМ<br>КОМПЬЮТЕРЕ ..... | 19 |
| 8.1  | Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 .....   | 19 |
| 8.2  | Для прибора iQ .....   | 21 |
| 8.3  | Для прибора iQ5 .....  | 22 |
| 9    | ЕЖЕДНЕВНАЯ РАБОТА С ТЕСТОМ (ПРОТОКОЛОМ) .....  | 23 |
| 9.1  | Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 .....   | 23 |
| 9.2  | Для прибора iQ .....   | 27 |
| 9.3  | Для прибора iQ5 .....  | 30 |
| 10   | РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ .....   | 35 |
| 10.1 | Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 .....   | 35 |
| 10.2 | Для прибора iQ .....   | 36 |
| 10.3 | Для прибора iQ5 .....  | 38 |
| 11   | УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ .....   | 41 |
| 12   | УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА  | 43 |
| 13   | УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ .....   | 44 |
| 14   | ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....  | 44 |
| 15   | АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ .....  | 45 |
|      | ПРИЛОЖЕНИЕ А .....   | 46 |
|      | ПРИЛОЖЕНИЕ Б .....   | 47 |

**ИНСТРУКЦИЯ**  
**по применению набора реагентов для количественного**  
**определения РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)**  
**методом обратной транскрипции**  
**и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)**

**ВИЧ–ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ**

**1 НАЗНАЧЕНИЕ**

- 1.1** Набор реагентов для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) ВИЧ–ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ предназначен для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1-го типа в образцах плазмы крови методом обратной транскрипции с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
- 1.2** Набор реагентов ВИЧ–ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ может быть использован в клинической практике для диагностики ВИЧ 1-го типа (ВИЧ-1) и для оценки эффективности антиретровирусной терапии.

**2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

**2.1** Принцип метода

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Исследование с использованием набора реагентов ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции, ПЦР-амплификация кДНК ВИЧ-1 в режиме реального времени.

На стадии выделения РНК в реакционную смесь добавляют внутренний контрольный образец (РНК-ВК), предназначенный для оценки эффективности всех этапов исследования.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (РНК-ВК), входит флуоресцентный краситель Hex.

Для проведения количественной оценки РНК ВИЧ-1, набор реагентов ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ включает калибровочные образцы ВИЧ-РНК-СТ в двух концентрациях:  $1 \times 10^6$  копий/мл и  $3 \times 10^3$  копий/мл.

Использование калибровочных образцов (ВИЧ-РНК-СТ) позволяет построить калибровочную прямую, при помощи которой можно определить концентрацию РНК ВИЧ-1 в исследуемых образцах плазмы крови.

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

| Fam | Hex    | Rox | Cy5 | Cy5.5 |
|-----|--------|-----|-----|-------|
| ВИЧ | РНК-ВК | -   | -   | -     |

2.2 Набор, включающий 96 пробирок со смесью для амплификации, рассчитан на проведение 44 определений неизвестных образцов (в двух повторах каждый).

## 2.3 Состав набора

Набор состоит из следующих комплектов:

### 1. **Комплект реагентов для выделения**

**нуклеиновых кислот** включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

### 2. **Калибровочные образцы:**

- ВИЧ-РНК-СТ1 ( $1 \times 10^6$  копий/мл) – 5 пробирок (по 0,3 мл);
- ВИЧ-РНК-СТ2 ( $3 \times 10^3$  копий/мл) – 5 пробирок (по 0,3 мл).

### 3. **Комплект реагентов для обратной транскрипции** включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (200 мкл);
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и праймеров для обратной транскрипции «ОТ-НАV+НСV+HDV+HGV+HIV и дНТФ» – 1 пробирка (100 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (50 мкл).

### 4. **Комплект реагентов для ПЦР-амплификации** включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 96 пробирок (по 20 мкл) или 12 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- полимеразу ТехноТaq – 1 пробирка (50 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец ДНК – 1 пробирка (150 мкл).

## 2.4 Время проведения анализа – 5 часов.

### 3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор реагентов выявляет следующие субтипы группы М ВИЧ-1: А, В, С, D, Е, F, G, H.

В образцах, содержащих РНК ВИЧ-1, определяется концентрация вируса в исследуемом материале. В образцах, не содержащих РНК ВИЧ-1, результат исследования должен быть отрицательным.

Чувствительность анализа: не более 200 копий на 1,0 мл плазмы.

Линейный диапазон концентраций РНК ВИЧ, определяемых детектирующим амплификатором, составляет  $5,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^8$  копий/мл образца.

Коэффициент вариаций результатов определений – не более 7%.

### 4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» и санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

Утилизировать неиспользованные реактивы, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологический материал необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

## 5 **ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

При работе с набором реагентов ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической (микробиологической) безопасности II класса;
- ПЦР-бокс;
- детектирующий амплификатор (ДТ-322, ДТлайт<sup>1</sup>, ДТпрайм<sup>2</sup>, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») или iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad));
- центрифуга для микропробирок, с RCF не ниже 16 000 x g;
- термостат твердотельный для пробирок типа «Эппендорф», поддерживающий температуру от 25 °С до 98 °С (например, Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичный);
- термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.», (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или аналогичный;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надсадочных жидкостей;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы электронные с адаптером и/или дозаторы механические переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2,0-20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;

---

<sup>1</sup> – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2

<sup>2</sup> – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6

- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.3<sup>3</sup>.
- файл с параметрами анализа «HIV\_RQ.ini».

**ВНИМАНИЕ!** Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании «ДНК-Технология».

## 6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

### 6.1 Взятие образцов периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

**ВНИМАНИЕ!** Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

---

<sup>3</sup> – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <https://www.dna-technology.ru/poequip/po-dlya-oborudovaniya>

## 6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

**ВНИМАНИЕ!** Время от взятия материала до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 8 °С.

## 6.3 Получение плазмы крови

6.3.1 Пробирки с кровью центрифугируйте при 800-1600 x g (соответствует 3000-4100 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424) в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

**ВНИМАНИЕ!** Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования (Приложение Б). Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

6.3.2 После центрифугирования отберите дозатором верхнюю фракцию (плазма) и перенесите в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

Допускается хранение полученной плазмы при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение трёх месяцев.

## 7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1 Выделение РНК из плазмы крови

#### Примечания

1. Перед началом работы необходимо достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка лизирующий раствор прогреть при 65 °С до полного растворения осадка. Затем перемешать лизирующий раствор переворачиванием флакона вверх дном 5-10 раз, избегая пенообразования.
2. На данном этапе используйте только наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
3. При работе с аспиратором используйте наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз.
4. Для повышения достоверности получаемых результатов на этапе выделения РНК исследуемые образцы необходимо

продублировать (для одного исследуемого образца провести две отдельные пробоподготовки).

5. При одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими (HCV и HIV) и ДНК-содержащими (HBV) вирусами, необходимо на стадии пробоподготовки внести два внутренних контроля (РНК-ВК+ДНК-ВК).

#### 7.1.1 Подготовьте образцы плазмы к использованию

- образцы плазмы, хранившиеся при температуре минус 18 °С и ниже, разморозьте при комнатной температуре или при температуре от 2 °С до 8 °С, перемешайте на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте 5 мин при 16000 x g. Для исследования необходимо использовать надосадочную жидкость, не затрагивая осадка (при его наличии).
- образцы плазмы, хранившиеся при температуре от 2 °С до 8 °С, а также отрицательный контрольный образец, РНК-ВК и калибровочные образцы перемешайте на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Свежеполученные образцы плазмы, не подвергавшиеся хранению при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С, перед использованием необходимо перемешать на вортексе в течение 3-5 с и осадить капли центрифугированием в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

#### 7.1.2 Пробирку с внутренним контрольным образцом (РНК-ВК) встряхните в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

#### 7.1.3 Для исследования промаркируйте следующее количество пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл (таблица 2):

- по две пробирки для каждого исследуемого образца плазмы крови;
- одну пробирку для отрицательного контрольного образца (К-);
- три пробирки для калибровочного образца ВИЧ-РНК-СТ1 (СТ1);
- три пробирки для калибровочного образца ВИЧ-РНК-СТ2 (СТ2).

Таблица 2 - Пример маркировки пробирок для проведения пробоподготовки

| Образец плазмы | «К-»          | ВИЧ-РНК-СТ1      | ВИЧ-РНК-СТ2      |
|----------------|---------------|------------------|------------------|
| Пробирка №1    | Пробирка «К-» | Пробирка «СТ1-1» | Пробирка «СТ2-1» |
| Пробирка №2    |               | Пробирка «СТ1-2» | Пробирка «СТ2-2» |
|                |               | Пробирка «СТ1-3» | Пробирка «СТ2-3» |

Например, для исследования 10 образцов необходимо промаркировать 27 пробирок (20 пробирок для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-», три пробирки для «СТ1» и три пробирки для «СТ2»).

7.1.4 Внесите во все промаркированные пробирки, кроме «СТ1» и «СТ2», по 10 мкл предварительно перемешанного внутреннего контрольного образца (РНК-ВК).

7.1.5 Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Закройте крышки пробирок.

**ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения контаминации следует перед внесением образцов открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего.

7.1.6 Внесите по 100 мкл предварительно перемешанной плазмы в пробирки для исследуемых образцов. В пробирки, промаркированные «СТ1» и «СТ2», внесите по 100 мкл соответствующего калибровочного образца. В пробирку, промаркированную «К-», внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца.

7.1.7 Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 с дважды и осадите капли центрифугированием в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре.

7.1.8 Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием при 16000 x g в течение 30 с при комнатной температуре.

7.1.9 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на вортексе в течение 3–5 с дважды.

- 7.1.10 Центрифугируйте пробирки при 16000 x g в течение 15 мин при комнатной температуре.
- 7.1.11 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.12 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1. Аккуратно переверните пробирки вверх-вниз, оmyвая стенки и крышку пробирки. Необходимо переворачивать каждую пробирку индивидуально.
- 7.1.13 Центрифугируйте пробирки при 16000 x g в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.14 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.15 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2. Аккуратно переверните пробирки вверх-вниз, оmyвая стенки и крышку пробирки. Необходимо переворачивать каждую пробирку индивидуально.
- 7.1.16 Центрифугируйте пробирки при 16000 x g в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.17 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.18 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °C в течение 5 мин.
- 7.1.19 Добавьте к осадку 16,5 мкл буфера для растворения, закройте крышки пробирок. Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.1.20 Прогрейте пробирки при температуре 65 °C в течение 10 мин. Осадите капли центрифугированием пробирок при 16000 x g в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат РНК необходимо сразу же использовать для постановки реакции обратной транскрипции и ПЦР, так как препарат РНК не подлежит хранению.

## **7.2 Проведение реакции обратной транскрипции**

- 7.2.1 Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при

температуре от 18 °С до 25 °С, затем встряхните пробирки на вортексе и центрифугируйте в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – В случае выпадения осадка в буферном растворе «ОТ-буфер» пробирку следует оставить при комнатной температуре до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

7.2.2 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

- 2,0х(N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»;
  - 1,0х(N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ–HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ»;
  - 0,5х(N+1) мкл обратной транскриптазы,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–», «СТ1», «СТ2».

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 27. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 28 (27+1) пробирок, т.е. 56 мкл ОТ-буфера + 28 мкл праймеров + 14 мкл обратной транскриптазы.

**ВНИМАНИЕ!** Обратную транскриптазу необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и центрифугируйте в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре.

7.2.4 Добавьте по 3,5 мкл ОТ-смеси во все промаркированные пробирки (включая «СТ1», «СТ2» и «К–»), смойте остатки ОТ-смеси пипетированием 5 раз и плотно закройте крышки пробирок.

7.2.5 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.

Примечание – Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

7.2.6 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 16000 x g в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание – Допускается хранение кДНК при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

### 7.3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

**ВНИМАНИЕ!** При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для исследуемых образцов плазмы крови, положительного контрольного образца ДНК (К+), отрицательного контрольного образца (К-) и по три пробирки для калибровочных образцов (СТ1 и СТ2).

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Нужно промаркировать 20 пробирок для исследуемых образцов; одну пробирку для «К-»; три пробирки для «СТ1», три пробирки для «СТ2» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 28.

Таблица 3 - Пример маркировки пробирок для проведения ПЦР

| Образец плазмы | «К-»          | ВИЧ-РНК-СТ1      | ВИЧ-РНК-СТ2      | «К+»          |
|----------------|---------------|------------------|------------------|---------------|
| Пробирка №1    | Пробирка «К-» | Пробирка «СТ1-1» | Пробирка «СТ2-1» | Пробирка «К+» |
| Пробирка №2    |               | Пробирка «СТ1-2» | Пробирка «СТ2-2» |               |
|                |               | Пробирка «СТ1-3» | Пробирка «СТ2-3» |               |

7.3.2 Разморозьте при комнатной температуре ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации.

7.3.3 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТақ на вортексе в течение 3–5 с, затем центрифугируйте в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре.

**ВНИМАНИЕ!** Полимеразу ТехноТақ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.4 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТақ. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10x(N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,5x(N+1) мкл полимеразы ТехноТақ,

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «К-», «СТ1», «СТ2», «К+».

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 28. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ для 29 (28+1) пробирок, т.е. 290 мкл ПЦР-буфера + 14,5 мкл полимеразы ТехноТақ.

- 7.3.5 Перемешайте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТақ на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

- 7.3.6 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТақ.

- 7.3.7 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

- 7.3.8 Встряхните пробирки с препаратом кДНК, «К-» и «К+» на вортексе и осадите капли центрифугированием в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты кДНК, положительный контрольный образец «К+», калибровочные образцы «СТ1» и «СТ2» следует вносить наконечниками с фильтром.

- 7.3.9 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (2 шт для каждого образца). В пробирки «К-», «К+», «СТ1» и «СТ2» кДНК не вносится.

- 7.3.10 Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и реакцию обратной транскрипции, в пробирку, промаркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца ДНК, в пробирку, промаркированную «К+».

- 7.3.11 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл кДНК соответствующего калибровочного образца в пробирки, маркированные «СТ1» и «СТ2» (3 шт. для каждого образца).

- 7.3.12 Центрифугируйте пробирки в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре.
- 7.3.13 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.
- 7.3.14 Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

Запустите программное обеспечение RealTime\_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HIV\_RQ.ini» (8.1). Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «HIV\_RQ» (9.1), укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (9.1.6) и проведите ПЦР.

При выборе теста «HIV\_RQ» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 4.

Таблица 4 - Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

| № блока | Температура, °С | мин | с   | Число циклов | Режим оптических измерений | Тип блока |
|---------|-----------------|-----|-----|--------------|----------------------------|-----------|
| 1       | 94,0            | 5   | 00  | 1            |                            | Цикл      |
| 2       | 94,0            | 0   | 10  | 50           | √                          | Цикл      |
|         | 58,0            | 0   | 25  |              |                            |           |
|         | 64,0            | 0   | 15  |              |                            |           |
| 3       | 10,0            | ... | ... | Хранение     |                            | Хранение  |

- 7.3.15 Для приборов iQ и iQ5:

Включите прибор и блок питания оптической части прибора, оставьте для прогрева на 30 минут. Запустите программное обеспечение iCycler (или Bio-Rad iQ5).

При первой постановке создайте и сохраните новый протокол (8.2, 8.3).

При последующих постановках выберите сохраненный протокол, настройте конфигурацию плашки (файл с данными о характеристике образцов и их расположении в плашке) (9.2, 9.3) и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

## 8 СОЗДАНИЕ ТЕСТА (ПРОТОКОЛА) ДЛЯ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ АМПЛИФИКАТОРОВ ПРИ ПЕРВОЙ ПОСТАНОВКЕ НА ДАННОМ КОМПЬЮТЕРЕ

8.1 Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

Версия ПО не ниже 7.3<sup>4</sup>.

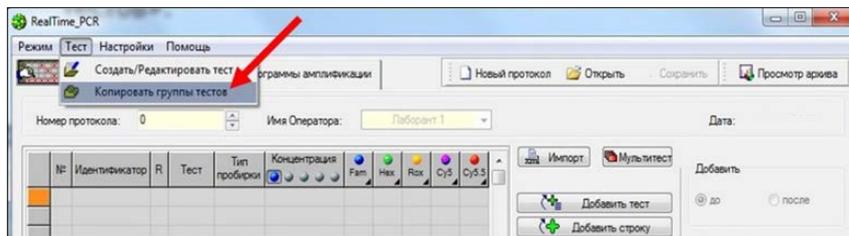
Примечание – Для иллюстраций в настоящей инструкции использованы скриншоты версии 7.9.5.15.

Создание нового теста в программе RealTime\_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

8.1.1 Откройте программное обеспечение RealTime\_PCR, выберите оператора, который будет работать с набором ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ, выберите режим «Работа с прибором».

При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

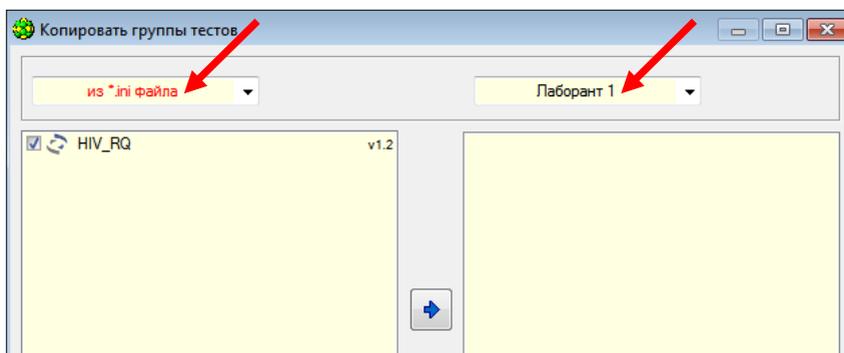
8.1.2 В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».



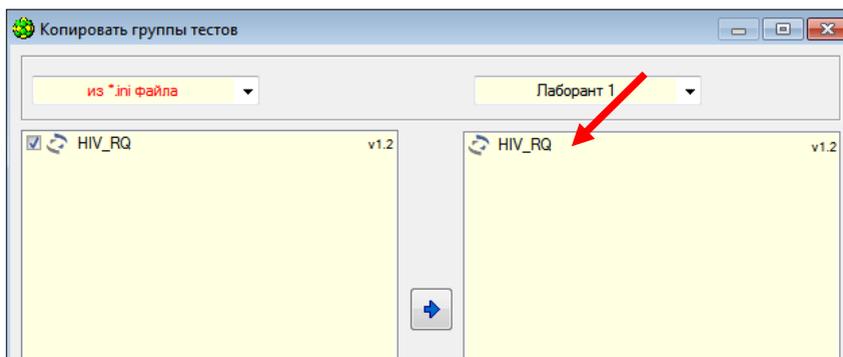
8.1.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из \*.ini файла», откройте ini файл «HIV\_RQ.ini».

<sup>4</sup> – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <https://www.dna-technology.ru/poequip/po-dlya-oborudovaniya>

- 8.1.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тест «HIV\_RQ».



- 8.1.5 Нажмите кнопку , после чего выбранный тест появится в правой половине окна.



Теперь с тестом «HIV\_RQ» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

## 8.2 Для прибора iQ:

- 8.2.1 Откройте программное обеспечение iCycler. Выберите «Library» в левой части окна программы.
- 8.2.2 Отредактируйте и сохраните файл dynamicwf.tmo (таблица 5).
- 8.2.3 Выберите «Производственный модуль» («Workshop») в левой части окна программы. Создайте и сохраните протокол (файл с программой амплификации) (таблица 5). Созданный файл будет сохранен в модуле «Library».

Примечание – Более подробное описание оформления протокола содержится в инструкции к прибору («Руководство пользователя» для iCycler iQ).

Таблица 5 - Режим амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

| Cycle   | Repeats | Step | Dwell Time | Setpoint, °C | PCR/Melt Data Acquisition |
|---|---------|------|------------|--------------|---------------------------|
| Программа для считывания динамических факторов лунок<br>dynamicwf.tmo |         |      |            |              |                           |
| 1   | 1       |      |            |              |                           |
|   |         | 1    | 00:30      | 80,0         |                           |
|   |         | 2    | 05:00      | 94,0         |                           |
| 2   | 10      |      |            |              |                           |
|   |         | 1    | 00:20      | 94,0         |                           |
|   |         | 2    | 00:20      | 58,0         |                           |
|   |         | 3    | 00:10      | 64,0         |                           |
| 3   | 1       |      |            |              |                           |
|   |         | 1    | 00:20      | 85,0         | Real Time                 |
| Программа амплификации  |         |      |            |              |                           |
| 4   | 40      |      |            |              |                           |
|   |         | 1    | 00:10      | 94,0         |                           |
|   |         | 2    | 00:10      | 58,0         |                           |
|   |         | 3    | 00:30      | 58,0         | Real Time                 |
|   |         | 4    | 00:20      | 64,0         |                           |
| 5   |         | ...  | ...        | 10,0         | storage                   |

### 8.3 Для прибора iQ5:

- 8.3.1 Откройте программное обеспечение Bio-Rad iQ5. Выберите «Производственный модуль» («Workshop») в левой части окна программы (при запуске программы открывается автоматически).
- 8.3.2 Нажмите кнопку «Protocol» для активации окна «Selected protocol» («Выбранный протокол»).
- 8.3.3 В окне «Selected protocol» нажмите кнопку «Create new» для создания нового протокола (файла с программой амплификации). Откроется окно «Editing Protocol» («Редактирование протокола»).
- 8.3.4 В поле «Editing protocol» введите название протокола.
- 8.3.5 Убедитесь, что все кнопки в области «Show Options» («Показать параметры») неактивны (то есть выключены).
- 8.3.6 Создайте протокол в электронной таблице, расположенной в нижней части окна «Editing Protocol» (таблица 6).

Таблица 6 - Программа амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ5 (при использовании Persistent Well Factor)

| Cycle | Repeats | Step | Dwell Time | Setpoint, °C | PCR/Melt Data Acquisition |
|-------|---------|------|------------|--------------|---------------------------|
| 1     | 1       |      |            |              |                           |
|       |         | 1    | 05:00      | 94,0         |                           |
| 2     | 50      |      |            |              |                           |
|       |         | 1    | 00:10      | 94,0         |                           |
|       |         | 2    | 00:25      | 58,0         | Real Time                 |
|       |         | 3    | 00:15      | 64,0         |                           |
| 3     | 1       |      |            |              |                           |
|       |         | 1    | 01:00      | 10,0         |                           |

8.3.7 Сохраните протокол, для этого нажмите на кнопку «Save & Exit Protocol Editing» («Сохранить и покинуть редактирование протокола»). Проверьте название протокола в диалоговом окне «Save As» («Сохранить как»), затем нажмите кнопку «Save» («Сохранить»).

Примечание – Вы можете выйти из Редактора протокола, нажав кнопку «Save & Exit Protocol Editing» или «Cancel & Exit Protocol Editing» («Отменить и выйти из редактирования протокола»).

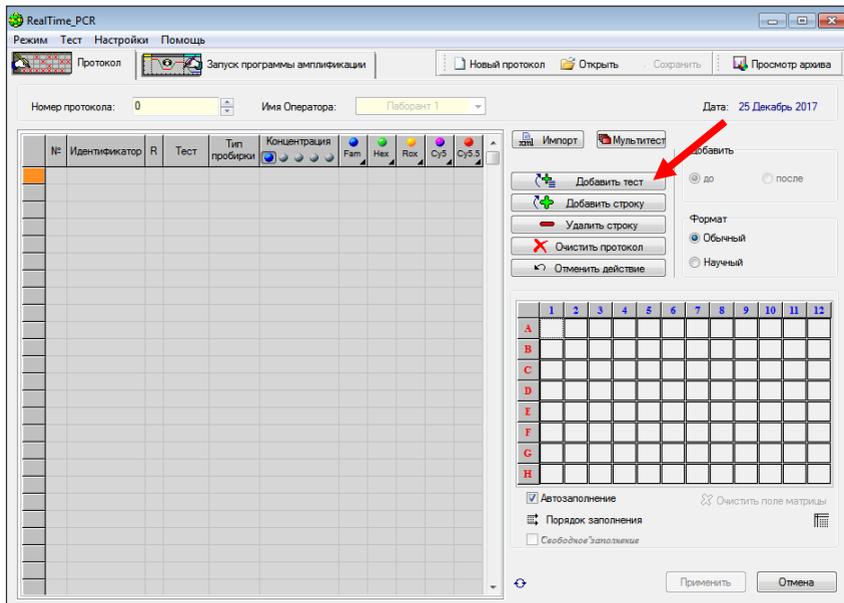
Более подробное описание оформления протокола содержится в инструкции к прибору («Руководство пользователя» для iCycler iQ5).

## 9 ЕЖЕДНЕВНАЯ РАБОТА С ТЕСТОМ (ПРОТОКОЛОМ)

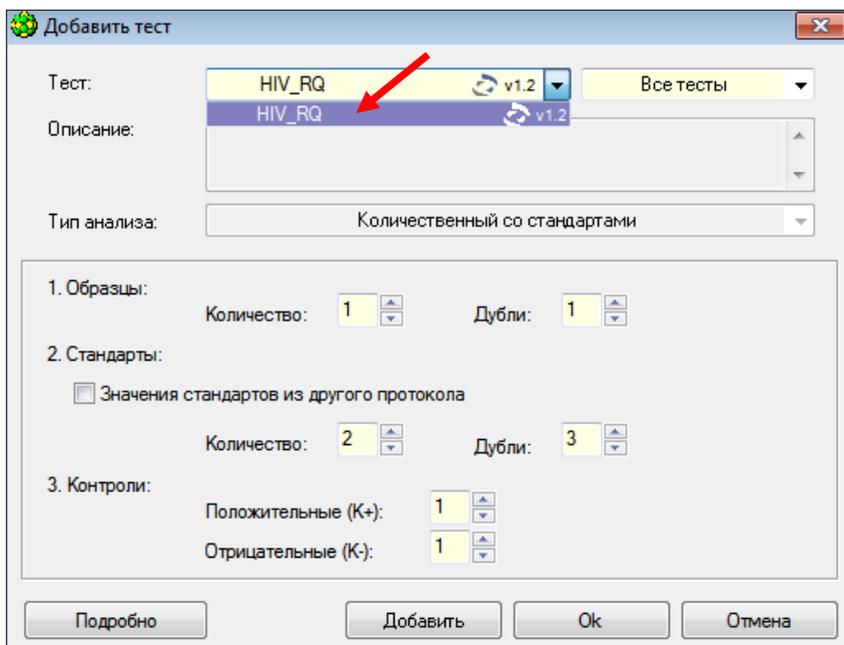
9.1 Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

9.1.1 Откройте программное обеспечение RealTime\_PCR, выберите оператора, для которого сохранили тест (8.1.1), выберите режим «Работа с прибором».

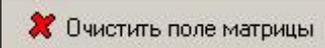
### 9.1.2 Нажмите кнопку «Добавить тест».

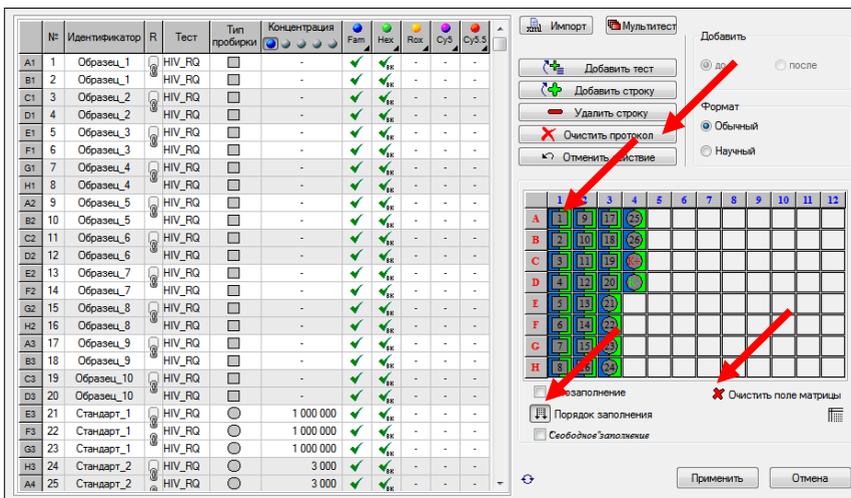


### 9.1.3 Выберите из списка тест «HIV\_RQ».





9.1.6 Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при необходимости нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» -  или «Очистить протокол»  и «Порядок заполнения»  ).



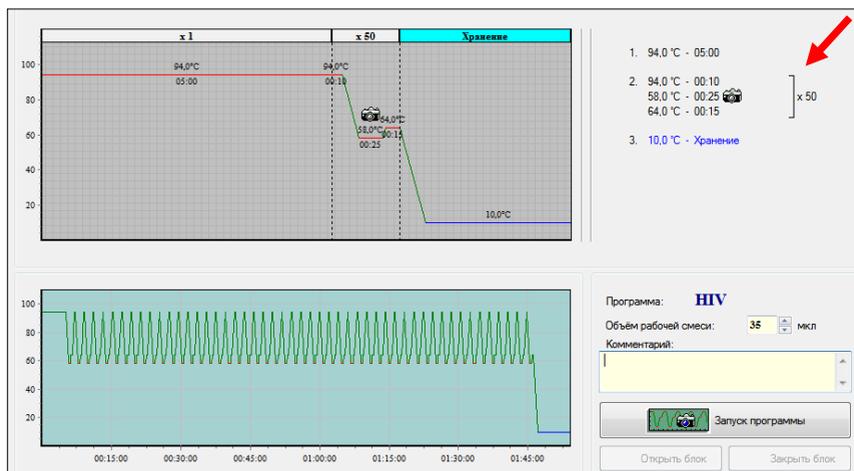
| №  | Идентификатор | R                        | Тест   | Тип пробирки             | Концентрация | Fam                                 | Hex                                 | Rox                                 | Cy3 | Cy5.3 |
|----|---------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----|-------|
| A1 | Образец_1     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| B1 | Образец_1     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| C1 | Образец_2     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| D1 | Образец_2     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| E1 | Образец_3     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| F1 | Образец_3     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| G1 | Образец_4     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| H1 | Образец_4     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| A2 | Образец_5     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| B2 | Образец_5     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| C2 | Образец_6     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| D2 | Образец_6     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| E2 | Образец_7     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| F2 | Образец_7     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| G2 | Образец_8     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| H2 | Образец_8     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| A3 | Образец_9     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| B3 | Образец_9     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| C3 | Образец_9     | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| D3 | Образец_10    | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| E3 | Образец_10    | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | -            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| F3 | Стандарт_1    | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | 1 000 000    | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| G3 | Стандарт_1    | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | 1 000 000    | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| H3 | Стандарт_2    | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | 3 000        | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |
| A4 | Стандарт_2    | <input type="checkbox"/> | HIV_RQ | <input type="checkbox"/> | 3 000        | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | -   | -     |

Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.

|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| B |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| C |   |   | 1 | 5 | 9  | 13 | 17 | 21 | 25 |    |    |    |
| D |   |   | 2 | 6 | 10 | 14 | 18 | 22 | 26 |    |    |    |
| E |   |   | 3 | 7 | 11 | 15 | 19 | 23 | 27 |    |    |    |
| F |   |   | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 |    |    |    |
| G |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| H |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |

9.1.7 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

9.1.8 В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации.



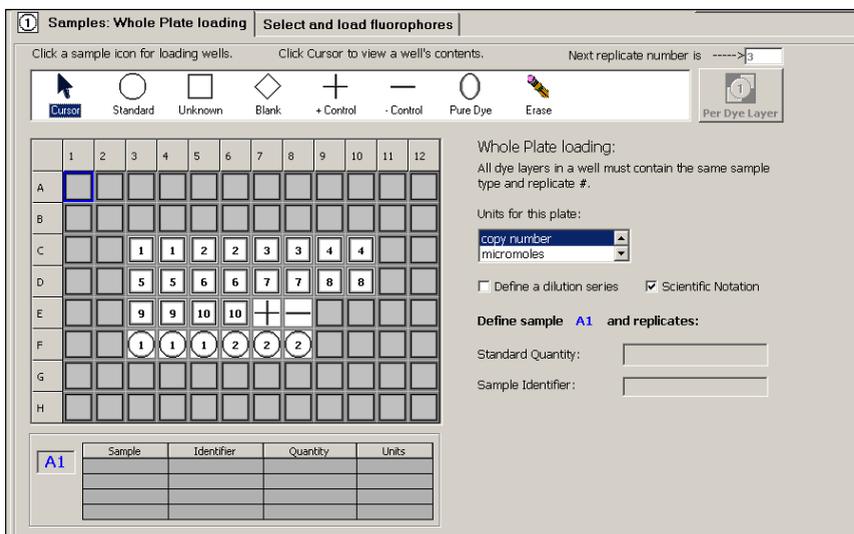
9.1.9 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

9.1.10 Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора (8.1.1)).

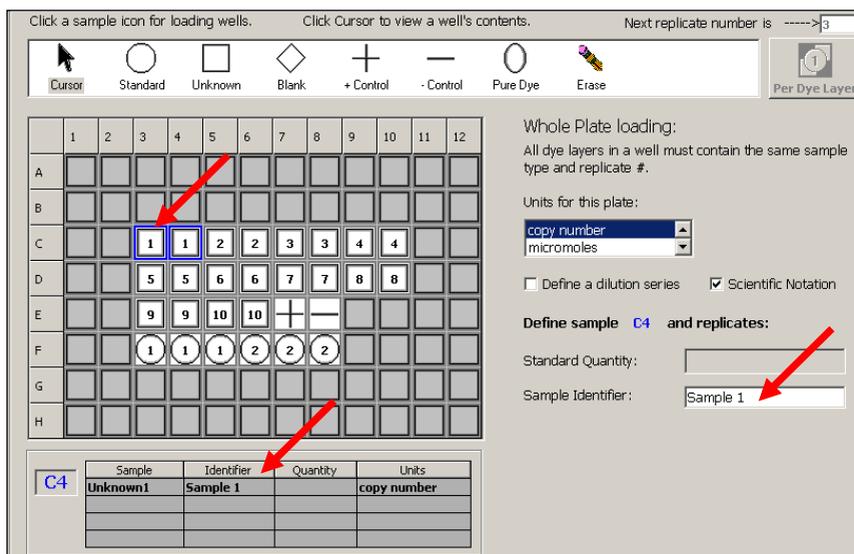
9.2 Для прибора iQ:

9.2.1 Откройте программное обеспечение iCycler. Для постановки ПЦР необходимо создать новый файл настройки плашки. Для этого нажмите на вкладку «View Plate Setup» в «Workshop» и создайте или отредактируйте файл конфигурации плашки.

9.2.2 Выберите вкладку «Samples: Whole plate loading», укажите расположение пробирок в термоблоке (образцы в дублях, положительный и отрицательный контрольные образцы, калибровочные образцы в трёх повторах).



9.2.3 Укажите идентификаторы образцов и концентрацию калибровочных образцов, выбрав в поле «Units» в правой части окна пункт «Copy number». Идентификаторы и концентрацию можно указывать после заполнения плашки, выделив курсором нужный образец.



|   |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |
|---|---|---|---|----|----|---|---|---|---|----|----|----|
|   | 1 | 2 | 3 | 4  | 5  | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |
| B |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |
| C |   | 1 | 1 | 2  | 2  | 3 | 3 | 4 | 4 |    |    |    |
| D |   | 5 | 5 | 6  | 6  | 7 | 7 | 8 | 8 |    |    |    |
| E |   | 9 | 9 | 10 | 10 | + | - |   |   |    |    |    |
| F |   | 1 | 1 | 1  | 2  | 2 | 2 |   |   |    |    |    |
| G |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |
| H |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |

Whole Plate loading:  
All dye layers in a well must contain the same sample type and replicate #.

Units for this plate:

Define a dilution series     Scientific Notation

Define sample **F4** and replicates:

Standard Quantity:   
Sample Identifier:

| Sample    | Identifier | Quantity | Units                 |
|-----------|------------|----------|-----------------------|
| <b>F4</b> | Standard1  | CT1      | 1,000e+06 copy number |
|           |            |          |                       |
|           |            |          |                       |

9.2.4 Нажмите на вкладку «Select and load fluorophores». Выберите флуорофоры FAM-490 и HEX-530. В окне 2 выберите соответствующие флуорофорам цвета.

① Samples: Whole Plate loading    Select and load fluorophores

1. Select or deselect a fluorophore:

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> CV3-530            | <input type="checkbox"/> ROX-575   |
| <input type="checkbox"/> CV5-635            | <input type="checkbox"/> SYBR-490  |
| <input checked="" type="checkbox"/> FAM-490 | <input type="checkbox"/> TAMRA-530 |
| <input checked="" type="checkbox"/> HEX-530 | <input type="checkbox"/> TET-490   |
| <input type="checkbox"/> JOE-530            | <input type="checkbox"/> TET-530   |
| <input type="checkbox"/> LC640-635          |                                    |

2. Assign a color:

|                |
|----------------|
| HEX-530        |
| Color not used |
| FAM-490        |
| Color not used |
| Erase          |

3. Enter plate notes:

Available Filter Wheels:

Define sample wells

|   |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |
|---|---|---|---|----|----|---|---|---|---|----|----|----|
|   | 1 | 2 | 3 | 4  | 5  | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |
| B |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |
| C |   | 1 | 1 | 2  | 2  | 3 | 3 | 4 | 4 |    |    |    |
| D |   | 5 | 5 | 6  | 6  | 7 | 7 | 8 | 8 |    |    |    |
| E |   | 9 | 9 | 10 | 10 | + | - |   |   |    |    |    |
| F |   | 1 | 1 | 1  | 2  | 2 | 2 |   |   |    |    |    |
| G |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |
| H |   |   |   |    |    |   |   |   |   |    |    |    |

4. Load well fluorophores by clicking to select a Fluor pen and then clicking wells that contain a defined sample:

### 9.2.5 Заполните плашку, отметив оба флуорофора.

|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C |   |   | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  |    |    |
| D |   |   | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  |    |    |
| E |   |   | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |   |    |    |    |
| F |   |   | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |   |    |    |    |
| G |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

9.2.6 Сохраните конфигурацию плашки, введя название файла настройки плашки в поле «Plate Setup Filename» и нажав «Save this plate setup». Созданный файл будет сохранен в модуле «Library».

Примечание – Для последующих постановок можно редактировать сохраненный файл настройки плашки, а не создавать его заново.

9.2.7 Выберите в модуле «Library» сохраненный ранее протокол, нажав вкладку «View Protocol». Затем перейдите во вкладку «View Plate Setup», выберите созданный файл настройки плашки. Нажмите кнопку «Run with selected protocol». Будет отображено окно «Run Prep» («Подготовка запуска»).

9.2.8 В меню «Select Well factor Source» выберите «Experimental Plate». Проверьте имена файлов протокола амплификации и настроек плашки, убедитесь, что файлы выбраны правильно. Укажите объем реакционной смеси – 35 мкл, нажмите «Begin Run» и сохраните в выбранной директории файл сбора и сохранения данных.

Примечание – Более подробное описание работы с прибором содержится в инструкции к прибору («Руководство пользователя» для iCycler).

### 9.3 Для прибора iQ5:

9.3.1 Откройте программное обеспечение Bio-Rad iQ5. Выберите «Производственный модуль» («Workshop») в левой части окна программы. Нажмите кнопку «Protocol» для активации окна «Selected protocol» («Выбранный протокол»).

9.3.2 Выберите необходимый каталог в левой части области просмотра файлов. Выберите необходимый файл с протоколом в правой части области просмотра файлов.

После выбора необходимого протокола его графическое и табличное представление отобразится в нижней части окна.

9.3.3 После выбора протокола перейдите к настройке конфигурации плашки. В «Производственном модуле» нажмите кнопку «Plate» для активации «Окна конфигурации плашки» («Selected Plate Setup»).

9.3.4 Нажмите кнопку «Create New» («Создать новую»), расположенную в нижнем правом окне исходного экрана в «Производственном модуле». Откроется окно «Editing Plate» («Редактирование плашки»).

9.3.5 В поле «Editing Plate» введите название файла настройки плашки. Введите объём в поле «Sample Volume» - «35», выберите способ герметизации в поле «Seal Type» и тип пластика в поле «Vessel Type».

9.3.6 Включите метку «Whole Plate loading» (активная метка подсвечивается зелёным цветом), нажмите кнопку «Select/Add Fluorophores» («Выбрать/добавить флуорофоры»).

9.3.7 В открывшемся окне «Fluor Selector» отметьте флуорофоры FAM и HEX (поставьте галочки в поле «Selected» напротив указанных флуорофоров). Нажмите кнопку «OK» для возврата в окно «Editing Plate».

9.3.8 Активируйте кнопку FAM.

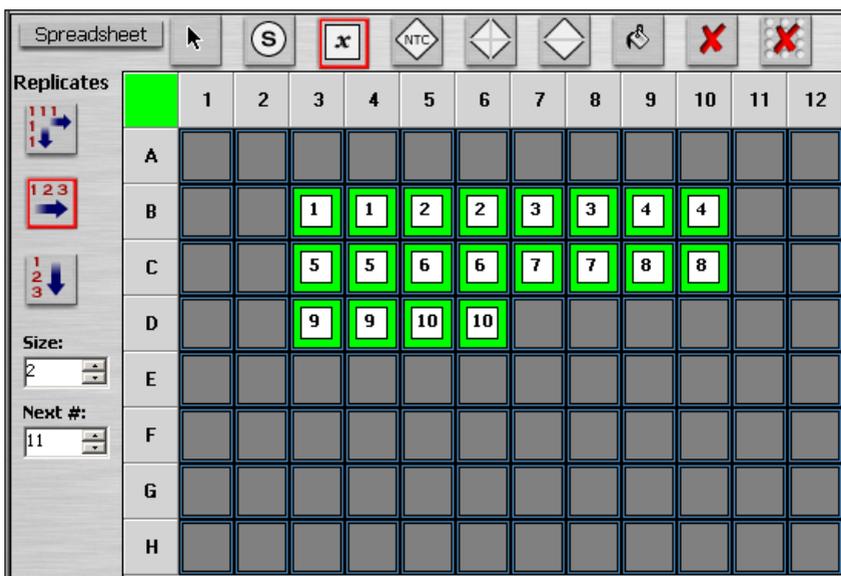
9.3.9 Укажите расположение неизвестных (исследуемых) образцов. Для этого щелкните по пиктограмме типа образца



(неизвестный образец); в зависимости от установки

пробирок нажмите кнопку  (повтор дублей по

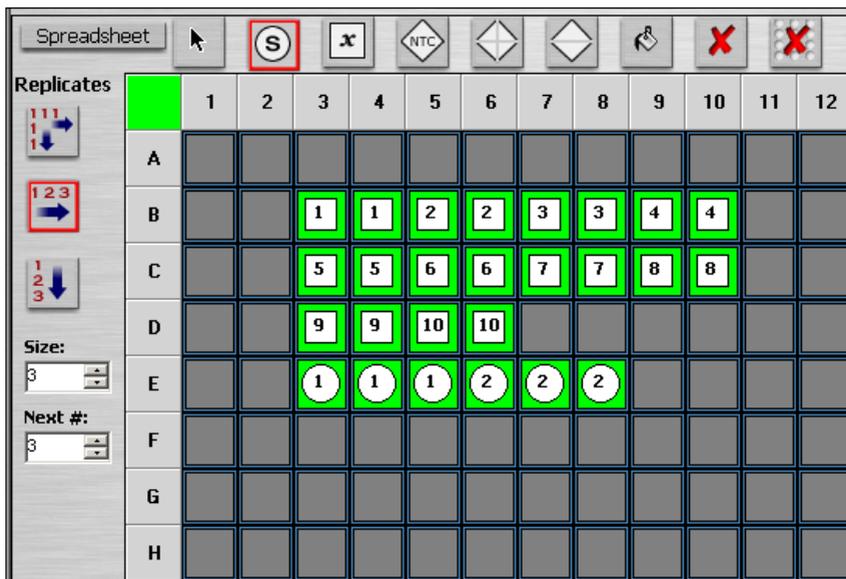
горизонтали), или кнопку  (повтор дублей по вертикали); укажите в поле «Size» количество дублей «2».



9.3.10 Укажите расположение калибровочных образцов. Для этого

щелкните по пиктограмме типа образца (стандарт),

нажмите кнопку (повтор образцов по горизонтали), укажите в поле Size количество повторов – «3». Отметьте нужные ячейки.



9.3.11 Укажите концентрацию калибровочных образцов. Последовательно выделите нужные ячейки курсором и введите в появившуюся внизу таблицу соответствующую концентрацию для каждого калибровочного образца.

The screenshot shows the 'Spreadsheet' tab with a 12x8 grid. The 'Replicates' column on the left has icons for 1, 2, and 3 replicates. The grid contains the following numbers in green boxes:

| Row | Col 1 | Col 2 | Col 3 | Col 4 | Col 5 | Col 6 | Col 7 | Col 8 | Col 9 | Col 10 | Col 11 | Col 12 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| A   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |
| B   |       |       | 1     | 1     | 2     | 2     | 3     | 3     | 4     | 4      |        |        |
| C   |       |       | 5     | 5     | 6     | 6     | 7     | 7     | 8     | 8      |        |        |
| D   |       |       | 9     | 9     | 10    | 10    |       |       |       |        |        |        |
| E   |       |       | 1     | 1     | 1     | 2     | 2     | 2     |       |        |        |        |
| F   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |
| G   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |
| H   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |

The summary table at the bottom shows the following data for the selected cell (E3):

| Row | Column | Sample Type | Rep # | Identifier/Condition | Quantity | Units       |
|-----|--------|-------------|-------|----------------------|----------|-------------|
| E   | 3      | Standard    | 1     | CT1                  | 1.00E+06 | copy number |

9.3.12 Укажите положительный и отрицательный контрольные образцы. Для этого щелкните по пиктограмме типа образца



(неизвестный образец), нажмите кнопку  (повтор образцов по горизонтали), укажите в поле Size количество дублей – «1». Отметьте нужные ячейки.

**ВНИМАНИЕ!** Положительный и отрицательный контрольные образцы необходимо указать как неизвестные!

9.3.13 Последовательно выделите нужные ячейки курсором и введите в появившуюся внизу таблицу соответствующее обозначение для каждого контрольного образца («Positive control» и «Negative control»).

The screenshot shows the 'Spreadsheet' tab with a 12x8 grid. The 'Replicates' column on the left has icons for 1, 2, and 3 replicates. The grid contains the following numbers in green boxes:

| Row | Col 1 | Col 2 | Col 3 | Col 4 | Col 5 | Col 6 | Col 7 | Col 8 | Col 9 | Col 10 | Col 11 | Col 12 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| A   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |
| B   |       |       | 1     | 1     | 2     | 2     | 3     | 3     | 4     | 4      |        |        |
| C   |       |       | 5     | 5     | 6     | 6     | 7     | 7     | 8     | 8      |        |        |
| D   |       |       | 9     | 9     | 10    | 10    | 11    | 12    |       |        |        |        |
| E   |       |       | 1     | 1     | 1     | 2     | 2     | 2     |       |        |        |        |
| F   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |
| G   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |
| H   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |

The summary table at the bottom shows the following data for the selected cell (D7):

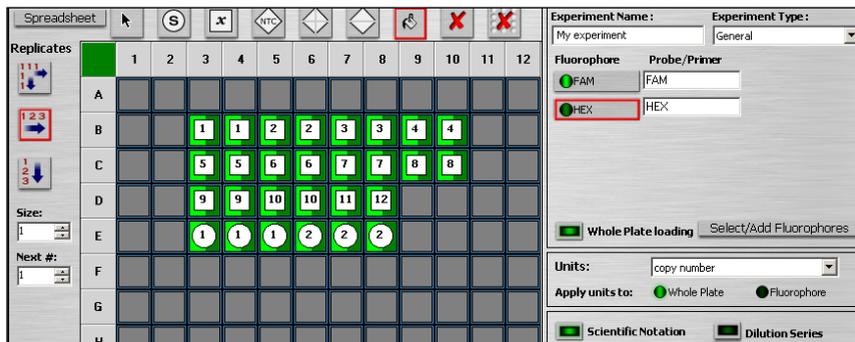
| Row | Column | Sample Type | Rep # | Identifier/Condition | Quantity | Units       |
|-----|--------|-------------|-------|----------------------|----------|-------------|
| D   | 7      | Unknown     | 11    | Positive control     | N/A      | copy number |

9.3.14 Активируйте кнопку HEX.



9.3.15 Выберите пиктограмму заливки плашки , щелкните по темно-зелёному квадрату в левом верхнем углу плашки.

Каждая заполненная ячейка в плашке должна быть окрашена в два цвета.



9.3.16 Сохраните настройки плашки, для этого щелкните по кнопке «Save & Exit Plate Editing» («Сохранить и покинуть редактирование плашки») в верхнем правом углу окна.

9.3.17 Проверьте название файла плашки в диалоговом окне «Save As» («Сохранить как»), затем нажмите кнопку «Save» («Сохранить»).

Примечание – Вы можете выйти из Редактора плашки, щелкнув по кнопке «Save & Exit Plate Editing» или по кнопке «Cancel & Exit Plate Editing» («Отменить и выйти из редактирования плашки»).

Для последующих постановок можно редактировать сохраненный файл настройки плашки, а не создавать его заново.

9.3.18 После выбора необходимого протокола и файла настройки плашки запустите выполнение протокола. Для этого нажмите кнопку «Run» в правом верхнем углу окна «Setup». Программа перейдет в модуль «Run-Time Central» («Модуль отображения текущего процесса»).

9.3.19 Отметьте окошко «Use Persistent Well Factors» в левой верхней области окна.



- 9.3.20 Проверьте условия постановки амплификации. Протокол, который будет выполняться, находится в нижнем левом углу окна, а настройка плашки, которая будет использоваться - в нижнем правом углу окна.
- 9.3.21 При необходимости внесите дополнительную информацию об исследовании в окно «Notes» («Примечания»). Эти примечания будут вставлены в экспериментальный файл. Нажмите кнопку «Begin Run» для запуска прогона. Откроется диалоговое окно «Save».
- 9.3.22 Наберите имя для файла оптических данных. iQ5 автоматически сохраняет данные во время эксперимента.

## **10 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ**

Регистрация сигнала проводится прибором во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.

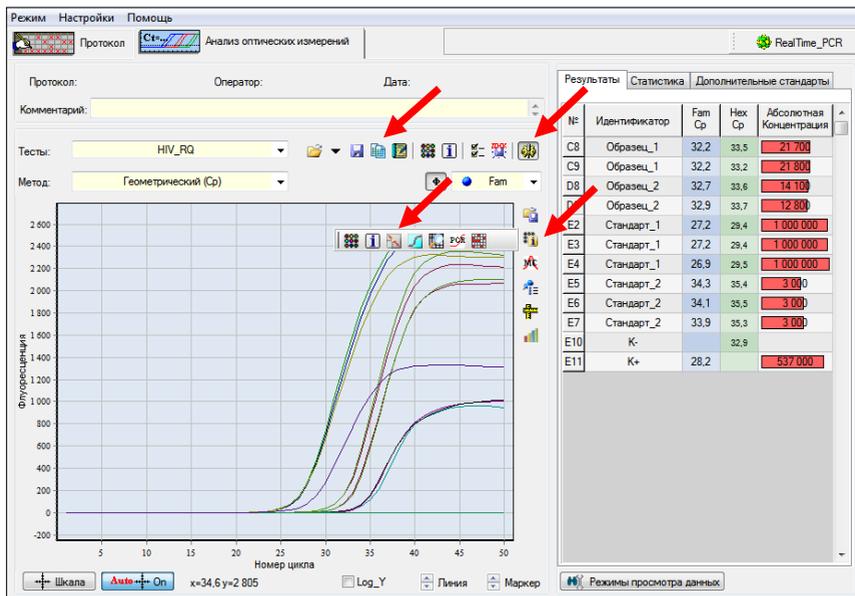
После окончания амплификации прибор построит калибровочную прямую, определит концентрацию вируса в анализируемых образцах и сформирует отчет по результатам анализа.

### **10.1 Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:**

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для каналов Fam и Hex, значение вирусной нагрузки в копиях/мл (количественный анализ).

График стандартной кривой вызывается на экран кнопкой .



По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

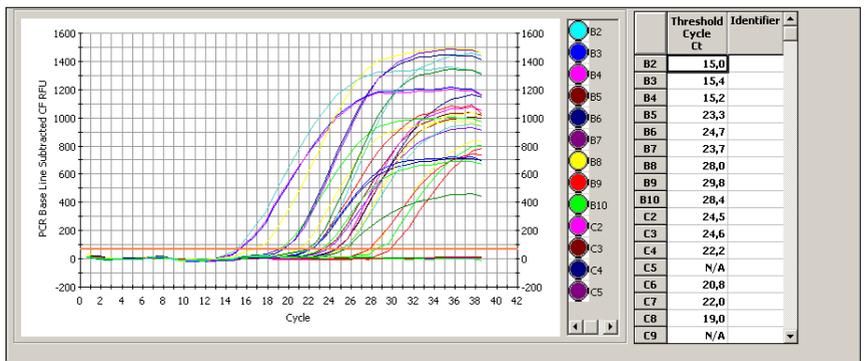
Для создания лабораторного отчёта необходимо нажать кнопку «Отчет» .

## 10.2 Для прибора iQ:

Анализ и представление результатов осуществляется в модуле «Data Analysis» («Анализ данных»).

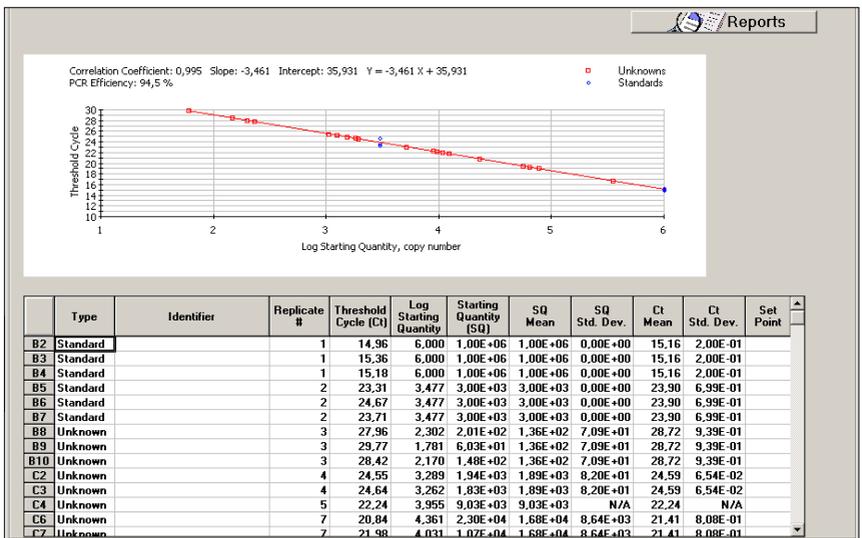
Закладка «PCR Quantification» включает в себя два окна:

- график амплификации,
- таблицу с показателями Ct и идентификаторами образцов.



Закладка «PCR Standard Curve» включает в себя:

- график стандартной кривой,
- таблицу результатов.



В таблице отображается следующая необходимая информация:

номер лунки;

**Type** – тип образца:

- **Unknown**– неизвестные образцы,
- **Standart** – калибровочные образцы (стандарты);

**Identifier** – идентификатор пробирки;

**Replicate** – номер образца в плашке;

**Threshold Cycle (Ct)** – пороговый цикл в данной пробирке;

**Log Starting Quantity** – значение логарифма концентрации;

**Starting Quantity (SQ)** – концентрация в данной пробирке;

**SQ Mean** – средняя концентрация в дублях;

**Ct Mean** – средняя величина порогового цикла в дублях.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания отчета необходимо:

1. Нажать кнопку «Reports». Откроется окно «Report Viewer» («Просмотр отчётов»).
2. Выбрать в поле «Select Report» («Выбор отчёта») пункт «Std Curve with Amp Cycle».
3. Выбрать в поле «Sort Data By» («Сортировка данных по...») пункт «Well» («Лунки»).
4. Выбрать метку «Ascending Order» («Сортировка по возрастанию»).

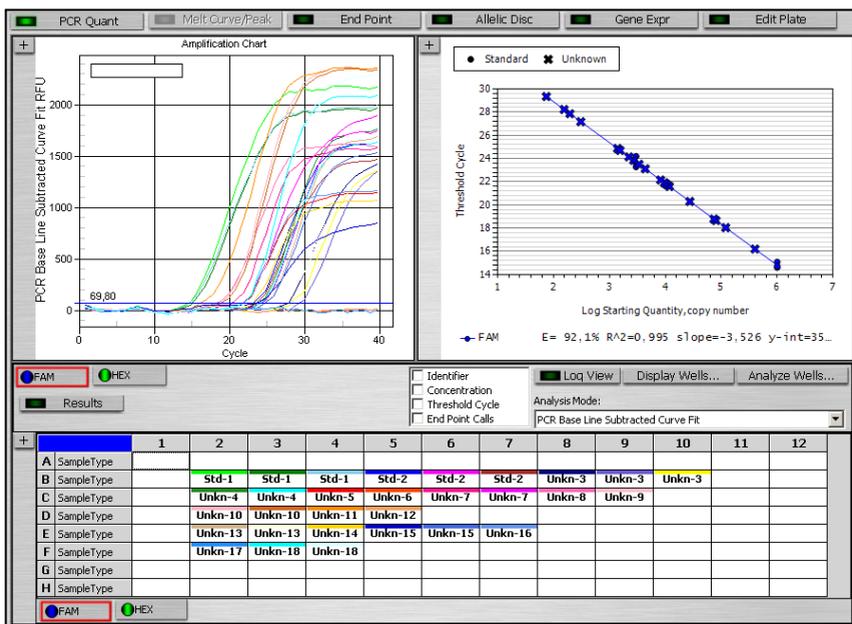
### 10.3 Для прибора iQ5:

Анализ и представление результатов осуществляется в модуле «Data Analysis» («Анализ данных»).

Нажмите кнопку «PCR Quant» («Количественный анализ ПЦР») для выбора закладки «PCR Quant».

Закладка PCR Quant включает в себя три окна:

- график амплификации;
- график стандартной кривой;
- таблицу результатов.



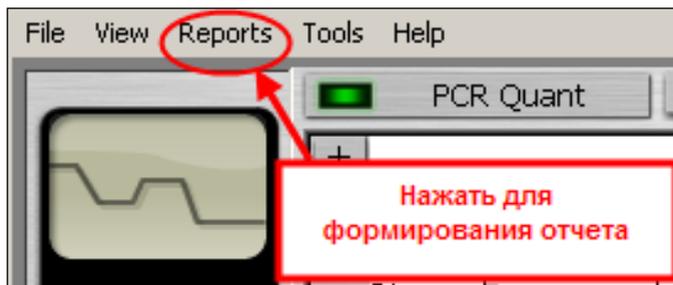
По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания отчета необходимо:

1. Выбрать оба флуорофора **FAM** и **HEX**. Выбранные флуорофоры выделены красной рамкой.



2. Щелкнуть по пункту «**Reports**» в меню программы.



Откроется окно «Report Viewer» («Просмотр отчётов»).

3. Выбрать в поле «Select Report» («Выбор отчёта») пункт «PCR Quant Detailed» («Детализированный отчёт о количественной ПЦР»).

4. Выбрать в поле «Sort Data By» («Сортировка данных по...») пункт «Well» («Лунки»).
5. Выбрать метку «Ascending Order» («Сортировка по возрастанию»).

PCR Quantification Report

Select Report:

PCR Quant Detailed

Sort Data By:

Well

Ascending Order

Descending Order

Результаты анализа представлены в разделе «**Standard Curve Spreadsheet Data**».

В таблице отображается следующая необходимая информация:

**Fluor** – флуорофор;

**Well** – номер лунки;

**Type** – тип образца:

- **Unkn (Unknown)** – неизвестные образцы,
- **Std (Standart)** – калибровочные образцы (стандарты);

**Ident** – идентификатор пробирки;

**Rep** – номер образца в плашке;

**Ct** – пороговый цикл в данной пробирке;

**Log SQ** – значение логарифма концентрации;

**SQ** – концентрация в данной пробирке;

**SQ Mean** – средняя концентрация в дублях;

**Ct Mean** – средняя величина порогового цикла в дублях.

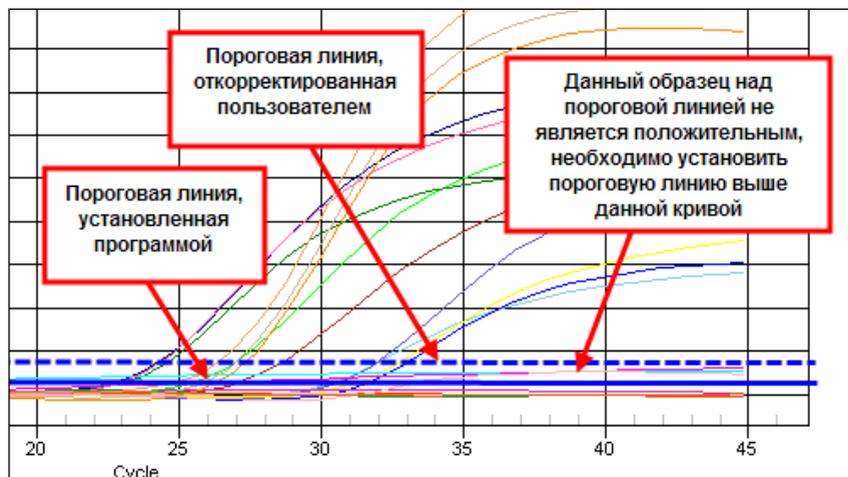
**ВНИМАНИЕ!** Концентрация вирусов в образце указана в «научном формате»: e+X обозначает X степень числа 10, например, «8,55e+03» следует читать, как «8,55x10<sup>3</sup>».

При выполнении 10.3 рекомендуется обратить внимание на высоту пороговой линии.

Графики кривых **положительных образцов** должны находиться **выше пороговой линии**, начиная с порогового цикла.

Графики кривых **отрицательных образцов** должны находиться **ниже пороговой линии**.

При необходимости скорректируйте пороговую линию.



## 11 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

### 11.1 Эффективность должна составлять $100 \pm 7\%$ .

Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7 - Интерпретация результатов ПЦР

| Канал детекции  |                                      | Интерпретация результата   |
|---|--------------------------------------|--|
| Fam,<br>значение в диапазоне<br>(SD Mean для iQ),<br>копий/мл | Hex,<br>значение Cp<br>(Ct для iQ5)* |  |
| <b>Анализируемые образцы</b>                                  |                                      |  |
| $5,0 \times 10^2 - 1 \times 10^8$                             | Не учитывается                       | Положительный результат с указанием вирусной нагрузки в образце (копий/мл)                                       |
| Менее $5,0 \times 10^2$                                       | Не учитывается                       | Положительный результат с указанием « <b>менее 500 копий/мл</b> » (без указания точного значения!)               |
| Более $1 \times 10^8$   | Не учитывается                       | Положительный результат с указанием « <b>более <math>10^8</math> копий/мл</b> » (без указания точного значения!) |
| Не указано<br>(для iQ N/A)                                    | Cp 29-34<br>(для iQ5 Ct 29-34)       | Результат отрицательный<br>(концентрация не указана)   |
| Не указано<br>(для iQ N/A)                                    | Не указано<br>(для iQ N/A)           | Результат недостоверный  |
| <b>Положительный контрольный образец</b>                      |                                      |  |
| $2,0 \times 10^5 - 9,0 \times 10^{5**}$                       | Не указано<br>(для iQ N/A)           | Положительный результат с указанием концентрации ДНК в образце (копий/мл)  |
| <b>Отрицательный контрольный образец</b>                      |                                      |  |
| Не указано<br>(для iQ N/A)                                    | Cp 29-34<br>(для iQ5 Ct 29-34)       | Результат отрицательный<br>(концентрация не указана)   |

11.2 Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР, либо повторное выделение РНК и постановку обратной транскрипции и ПЦР для этого образца, либо взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

\* – если значение Cp (Ct) по каналу Hex больше указанного, результат недостоверный!

\*\* – если в положительном контрольном образце определяемая концентрация ДНК выходит за рамки диапазона  $2,0 \times 10^5 - 9,0 \times 10^5$  копий/мл, необходимо повторить исследование.

**11.3** При получении недостоверного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

**11.4** При получении положительного результата на наличие РНК ВИЧ в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

## **12 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**12.1** Транспортирование набора осуществляется в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре от 0 °С до 8 °С не более 72 часов.

**12.2** Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

**12.3** При хранении лизирующего раствора допускается выпадение осадка, который перед использованием растворяется прогреванием при 65 °С.

**12.4** Пробирки (стрипы) со смесью для амплификации, запечатанной парафином, калибровочные образцы (ВИЧ-РНК-СТ1 и ВИЧ-РНК-СТ2), ПЦР-буфер, минеральное масло, положительный контрольный образец следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

**12.5** ОТ-буфер, праймеры ОТ-NAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ, обратную транскриптазу, полимеразу ТехноТaq следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

**12.6** Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре от минус 18 °С до 22°С в течение всего срока годности набора, а также их многократное замораживание-оттаивание.

- 12.7** Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.
- 12.8** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 12.9** Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

## **13 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ**

- 13.1** Наборы с истекшим сроком годности и неиспользованные реактивы утилизируют в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 13.2** Непригодные для использования наборы реагентов, упаковка набора реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относятся к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами.

## **14 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ**

- 14.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 14.2** Срок годности набора – 9 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

## **15 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ**

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12,  
тел./факс +7 (495) 640-17-71.

Служба клиентской поддержки:  
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),  
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru), [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)

**Адрес производителя:**

ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

**Место производства:**

Код изготовителя указан на этикетке (см. последнюю цифру в серии набора):

1. ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.
2. ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Номер 047-17  
2021-07-16

Приложение А  
(справочное)

Символы, используемые при маркировке набора реагентов

|   |  |
|---|--|
|    | Медицинское изделие для диагностики in vitro |
|    | Температурный диапазон                       |
|    | Количество тестов                            |
|    | Годен до                                     |
|    | Серия набора                                 |
|    | Дата изготовления                            |
|    | Обратитесь к инструкции по применению        |
|    | Каталожный номер                             |
|    | Адрес изготовителя                           |
|   | Не допускается воздействие солнечного света  |
|  | Не стерильно                                 |
|  | Одноразовое использование                    |

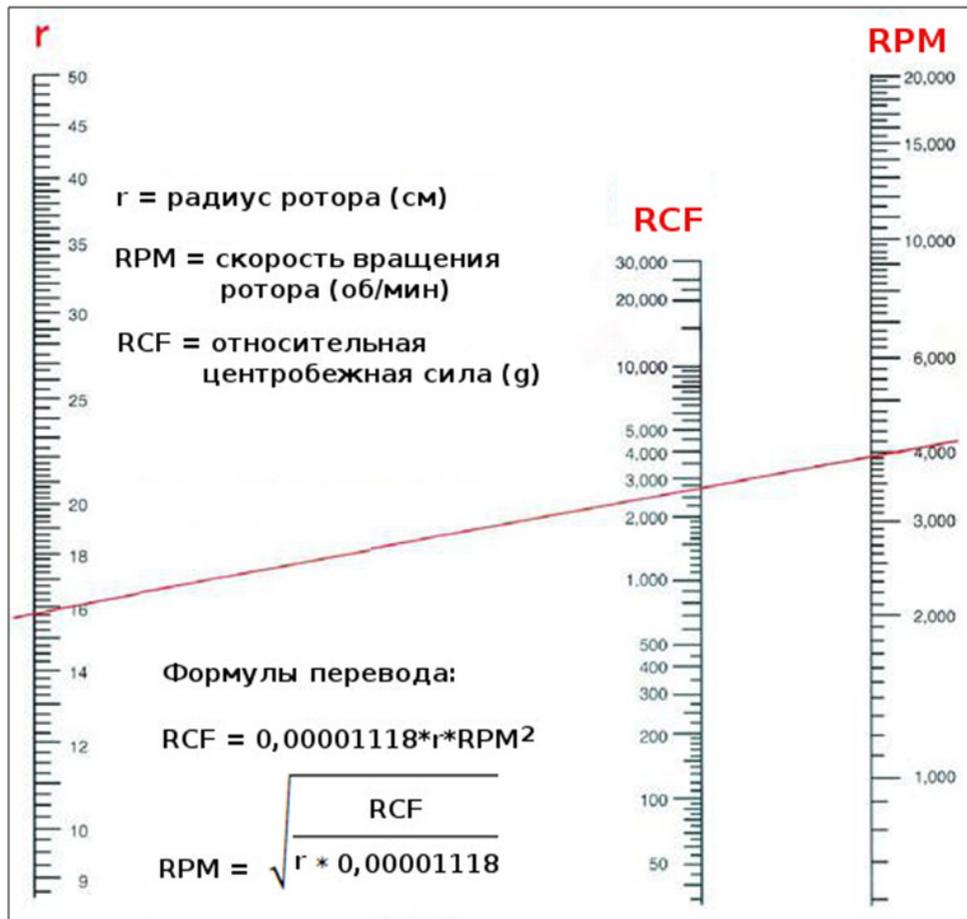
Символы и обозначения опасности  
при маркировке набора реагентов

|   |  |
|---|--|
|  | Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению |
|---|--|

## Приложение Б

(справочное)

Номограмма и формула перевода относительного ускорения центрифуги (RCF) в скорость вращения (RPM) в зависимости от диаметра ротора



ООО «ДНК-Технология»  
117587, Россия, г. Москва,  
вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,  
ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12  
Тел./факс +7 (495) 640-17-71  
Служба клиентской поддержки:  
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный)  
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)  
E-mail: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru)