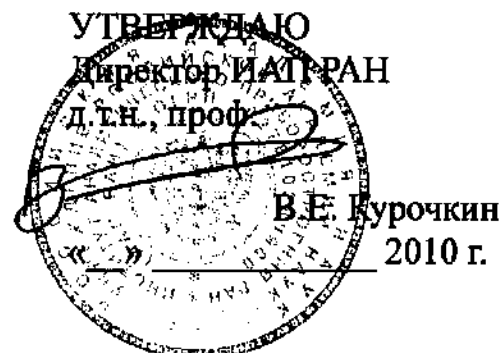


УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РАН

ОКП 94 4340



Устройство компьютеризированное четырехканальное для обнаружения
в режиме реального времени флуоресцентной детекцией
специфической последовательности нуклеиновых кислот
методом полимеразной цепной реакции «АНК»

Руководство по эксплуатации

ДШИ2.848.001 РЭ

Санкт-Петербург
2010

Содержание:

1 Описание устройства для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот «АНК»	3
1.1 Назначение.....	3
1.2 Технические характеристики.....	4
1.3 Комплектность	5
1.4 Требования к компьютеру.....	5
1.5 Принцип действия устройства.....	6
2 Меры безопасности.....	10
3.1 Подключение устройства к компьютеру	11
3.2 Установка программного обеспечения.....	12
3.3 Включение	12
4.1 Установка образцов	13
4.2 Выбор режима работы.....	14
4.3 Редактирование режима работы	15
4.4.Выбор красителей	16
4.5 Ввод сведений об образцах.....	17
4.5.1 Расшифровка сокращенных обозначений:	17
4.5.2 Особенности ввода параметров калибровочного образца «КО ?».....	18
4.6 Сохранение	19
4.7 Запуск измерений.....	20
4.8 Прием данных	21
5 Работа в режиме «Постоянная температура».....	25
5.1 Контроль работы с помощью табло теплового блока	27
6 Работа в режиме «Циклический»	30
6.1 Контроль работы с помощью табло теплового блока	32
7 Обработка	33
7.1 Определение порогового цикла.....	33
7.2 Качественный анализ.....	36
7.3 Количественный анализ	37
8 Работа в режиме «Плавление».....	39
8.1 Контроль работы с помощью табло теплового блока	40
8.2 Обработка результатов.....	41
9 Настройка	43
10 Техническое обслуживание	53
11 Текущий ремонт.....	53
12 Хранение и транспортировка.....	58
ДЛЯ ЗАМЕТОК.....	59

ВНИМАНИЕ! Устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот «АНК» не является средством измерений и не нуждается в ежегодной поверке.

К паспорту прилагаются копии Регистрационного удостоверения №ФС 022a2005/2163-05 от 23 августа 2005 года и Сертификата соответствия № РОСС RU.МЕ01.Н00423 от 03.05.2007.

Эти сертификаты подтверждают, что Устройство АНК зарегистрировано в Российской Федерации, внесено в Государственный реестр изделий медицинского назначения и медицинской техники, удовлетворяет требованиям ГОСТов по электробезопасности и электромагнитной совместимости и является изделием лабораторной медицинской техники, которое не имеет контакта с пациентами (Код ОКП 94 4340).

1 Описание устройства

Полное название в соответствии с ТУ 9443-003-04699534-2005:

Устройство компьютеризированное четырехканальное для обнаружения в режиме реального времени флуоресцентной детекцией специфической последовательности нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции «АНК».

1.1 Назначение

Устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот – «АНК», в дальнейшем – устройство, предназначено для качественного и количественного определения фрагментов нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Область применения:

- диагностические центры,
- поликлиники,
- станции переливания крови,
- больницы,
- учреждения санитарно-эпидемиологического контроля,
- НИИ,
- высшие учебные заведения и т.д.

Устройство зарегистрировано в Российской Федерации и внесено в государственный реестр изделий медицинского назначения и медицинской техники.

Регистрационное удостоверение:

№ ФС 022a2005/2163-05 от 23 августа 2005 года.

Новизна технических решений подтверждена патентом на изобретение «Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты» № 2304277 от 10 августа 2007 г.

1.2 Технические характеристики

Количество каналов возбуждения и регистрации флуоресценции	4
Длины волн возбуждения флуоресценции, нм	485, 530, 580, 630
Длины волн регистрации флуоресценции, нм	520, 560, 620, 670
Порог чувствительности по флуоресцеину, М	$5 \cdot 10^{-9}$
Количество лунок для пробирок с пробами	16, 32 или 96
Объем пробирок, мл	0,2
Динамическое термостатирование пробирок с пробами по задаваемой циклограмме в диапазоне, °С	4 – 99
Разброс температур по лункам, °С	$\pm 0,4$
Погрешность установки среднего значения температуры в лунке в диапазоне от 40 до 95, °С	$\pm 0,5$
Скорость нагревания (охлаждения) пробирок не менее, °С в секунду	1,2
Нагрев крышки термостатируемого блока, °С	105 ± 2
Габариты, мм	350x400x440
Масса, кг	28
Питание от сети переменного тока:	
- напряжение, В	187-242
- частота, Гц	50

1.3 Комплектность

В комплект устройства входят (см. рисунок 1.1):

- устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот «АНК» (тепловой блок (1) и оптический блок (2));
- кабель соединительный;
- шнур сетевой;
- кабель связи с ПЭВМ «RS-232»;
- компакт-диск с программным обеспечением;
- ПЭВМ (в обязательный комплект поставки не входит);
- транспортная упаковка;
- руководство по эксплуатации;
- паспорт.

1.4 Требования к компьютеру

Компьютер должен удовлетворять следующим минимальным требованиям:

- полная совместимость с IBM PC/AT (процессор 486DX и выше);
- дисковод 1.44 Мбайт и CD-ROM;
- графическая карта и монитор VGA;
- 16 Мбайт ОЗУ (рекомендуется 32 Мбайт и более);
- мышь или другое Windows-совместимое аналогичное устройство;
- 6 Мбайт свободного места на жестком диске (для инсталляции программы) и 10 Мбайт для записи данных;
- операционная система Windows 95TM, Windows 98TM и более новые;
- наличие свободного порта RS232;
- разъем для подсоединения принтера (принтерный порт);
- один принтерный порт с интерфейсом Centronics;
- Microsoft WindowsTM совместимый принтер.

1.5 Принцип действия устройства

Работа устройства основана на применении метода полимеразной цепной реакции с одновременной детекцией сигнала флуоресценции непосредственно в течение амплификации. Устройство позволяет проводить мультиплексный анализ пробы с выявлением до 4-х агентов в одном образце.

Для реализации условий полимеразной цепной реакции, анализируемые образцы смешиваются в пробирках с реакционной смесью, в состав которой входят:

- праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, которые обеспечивают специфичность реакции;
- Taq ДНК-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК;
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, используется Taq ДНК-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК;
- интеркалирующий краситель или специфические зонды;
- буфер - смесь катионов и анионов, обеспечивающих оптимальные условия для реакции.

Используются одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР с герметичными крышками. Пробирки устанавливаются в термостат, работающий в циклическом температурном режиме. При нагревании пробирок до 95°C молекулы анализируемых образцов ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени и ограничивают искомый фрагмент. При температуре порядка 60°C Taq ДНК-полимераза достраивает вторую цепь ДНК с 3'-конца праймера.

При малой концентрации анализируемых образцов температурный цикл амплификации повторяется до 35 раз. Реактивы обеспечивают избирательность полимеразной цепной реакции и позволяют выделить искомую ДНК на фоне других. При каждом цикле амплификации, синтезированные ранее фрагменты, вновь копируются Taq ДНК-полимеразой. При этом происходит экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК. Концентрация исходных специфических фрагментов ДНК увеличивается приблизительно как 2^N , где N- количество циклов.

В основе используемого метода лежит наблюдение в реальном времени сигналов флуоресценции в ходе реакции. Увеличение сигналов происходит благодаря использованию специфического для данной ДНК зонда, который подобно праймеру в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК. В ходе синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется. Он содержит на 5' конце флуоресцентный краситель, а на 3' конце - гаситель флуоресценции. После расщепления происходит разобщение красителя и гасителя, что приводит по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

Процесс завершения ПЦР обусловлен расходом реагентов при накоплении специфических продуктов амплификации. При этом увеличение сигнала флуоресценции прекращается.

По изменению сигнала флуоресценции можно проследить кинетику ПЦР и использовать полученные данные для расчета значения порогового цикла – величины, позволяющей судить об исходном количестве копий ДНК и сравнивать образцы между собой.

В устройстве применен четырехцветный флуориметр, благодаря которому устройство позволяет использовать до четырех красителей и обнаружить до четырех разных специфических фрагментов ДНК в каждой пробирке одновременно.

Например, для обнаружения и определения процентного содержания генетически модифицированной сои (ГМ) Roundup Ready™ используются две независимые реакции в одной пробирке. Одна реакция позволяет обнаружить присутствие ДНК гена лектина, который присутствует как в ГМ, так и в обычной сое. Другая реакция позволяет обнаружить присутствие в геноме сои генетической модификации. Наличие положительной динамики для обеих реакций говорит о наличии ГМ сои, а сравнение значений порогового цикла позволяет определить процентное содержание ГМ в общем количестве ДНК сои. Каждая реакция имеет свой флуоресцентный краситель. Для обнаружения лектина сои используется зонд, меченый R6G, а для ГМ – зонд, меченый ROX.

В устройстве с помощью источника света флуориметрического модуля используемые флуоресцентные красители в пробирках возбуждаются поочередно в течение каждого температурного цикла, одновременно наблюдается их флуоресценция. По мере накопления продуктов реакции происходит возрастание сигналов флуоресценции.

По результатам регистрации флуоресценции рассчитывается пороговый цикл, при котором сигнал флуоресценции становится доступным для определения.

Целью качественного анализа является подтверждение присутствия в исследуемых образцах специфических фрагментов ДНК. Чтобы проверить реактивы, рекомендуется одновременно с исследуемыми образцами устанавливать в тепловой блок положительные и отрицательные контрольные образцы.

Количественный анализ выполняется методом сравнения с использованием калибровочных образцов с известной концентрацией специфических фрагментов ДНК.

В оптическом блоке имеется тепловая крышка, служащая для подогрева верхней части пробирок до температуры выше 100°C. Таким образом устраняется нежелательная конденсация капелек воды на стенках и крышках пробирок.

1.6 Внешний вид устройства

На оптическом блоке (2) расположена ручка (3), служащая для прижима крышек пробирок с пробями (см. рисунок 1.1).

На лицевой панели теплового блока (1) расположена клавиатура, индикаторное табло и три светодиода.

На тепловом блоке находится защелка (4), фиксирующая оптический блок относительно теплового блока.



Рисунок 1.1 - Внешний вид устройства «АНК»

На задней панели теплового блока (см. рисунок 1.2) находится тумблер включения-выключения устройства (5), а также разъемы, к которым подсоединяются сетевой шнур (6) и кабель канала последовательной связи RS-232 (7). Обе части устройства соединены жгутом (8).

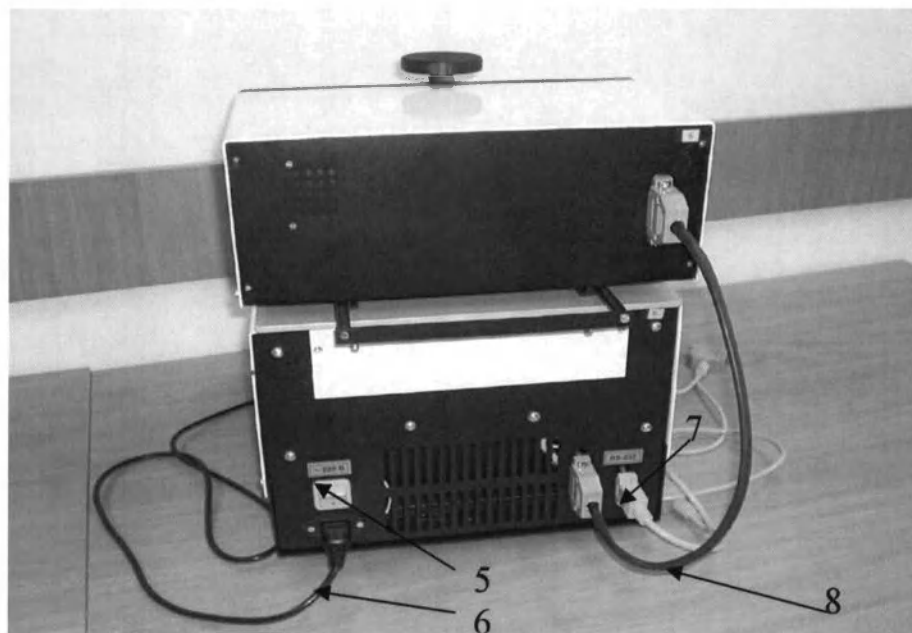


Рисунок 1.2 - Вид устройства «АНК» сзади

2 Меры безопасности

Устройство по требованиям безопасности соответствует ГОСТ Р 52319 и выполнено в части электробезопасности как оборудование, имеющее категорию монтажа II и степень загрязнения I при питании от сети 220 В, 50 Гц.

Устройство имеет съемный трёхпроводный шнур с пластмассовой изоляцией и вилкой с заземляющим контактом.

В конструкции устройства предусмотрены все необходимые меры, обеспечивающие невозможность случайного доступа к токоведущим частям.

Безопасность труда при эксплуатации устройства регламентируется «Правилами технической эксплуатации электроустановок потребителей» и «Правилами техники безопасности при эксплуатации установок потребителей».

Все виды работ по техническому обслуживанию производить при отключенном от сети устройстве и компьютере (необходимо обеспечить видимые разрывы).

К работе с устройством допускаются лица, имеющие необходимую квалификацию, навыки работы на компьютере, изучившие данное руководство по эксплуатации и программное обеспечение устройства.

При работе с устройством должны быть соблюдены все меры технической безопасности, относящиеся к подобному классу приборов.

Запрещается:

- самостоятельная разборка устройства, а также работа со снятыми крышками (включение устройства со снятой крышкой приводит к выходу из строя фотоэлектронного умножителя);
- подключение устройства к сети, если сетевой тумблер на задней стенке установлен в положение «ВКЛ»;
- подключение устройства и компьютера к сети, если сетевые розетки не имеют третьего заземляющего контакта;
- оставлять работающее устройство без надзора;
- располагать устройство на загроможденном рабочем столе.

Внимание!

В устройстве имеются детали с высокой температурой: тепловая крышка в нижней части оптического блока и планшет для пробирок теплового блока. Для устранения возможного ожога запрещается касаться этих деталей голыми руками. Перед установкой пробирок рекомендуется установить комнатную температуру теплового блока.

3 Подготовка устройства к использованию

Перед началом работы производится внешний осмотр устройства. В процессе осмотра необходимо убедиться в отсутствии механических повреждений.

После транспортирования и хранения при отрицательных значениях температуры перед расконсервацией устройство должно быть выдержано в нормальных условиях не менее 24 час.

Размещение устройства необходимо производить в помещении, не содержащем высоких концентраций паров агрессивных химических веществ. Установку устройства производят на столе в строго горизонтальном положении. Лабораторный стол должен располагаться на расстоянии не менее 1 м от отопительных приборов. Расстояние от задней стенки устройства до стены помещения должно быть не менее 0,2 м.

Внимание!

При размещении устройства необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей и других излучений.

3.1 Подключение устройства к компьютеру

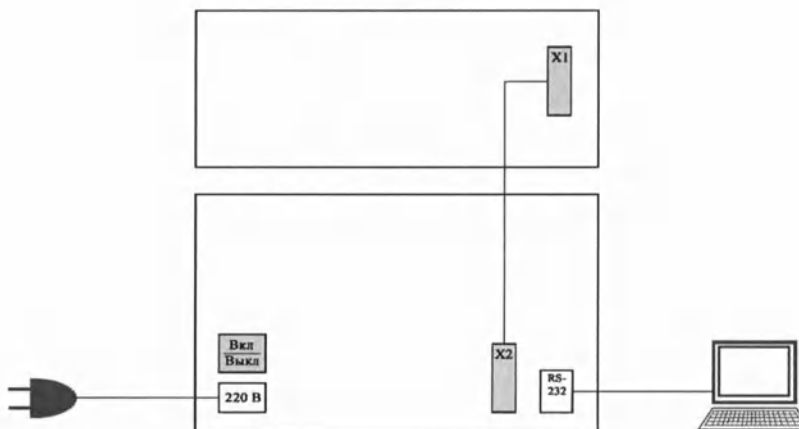


Рисунок 3.1 – Схема подключения устройства "АНК"

Подключить разъем с маркировкой «RS-232» к компьютеру посредством кабеля. Устройство подключается к одному из разъемов последовательного интерфейса типа RS-232 (COM1, COM2, COM3 или COM4).

Соединить кабелем тепловой блок и оптический блок.

Подключить устройство к сети переменного тока 220 В 50 Гц с помощью штатного сетевого комплекта.

Включить компьютер и монитор, нажав пусковые кнопки.

3.2 Установка программного обеспечения

Установить прилагаемый компакт-диск в компьютер. Установка программного обеспечения должна начаться автоматически. Если это не произошло, необходимо запустить файл Setup.exe на компакт-диске.

Следуйте указаниям программы установки.

Вам будет предложено:

- выбрать каталог для установки программы;
- установить номер порта: (обычно COM1);
- задать пояснительную строку названия программы.

По окончании установки будет создан ярлык «АНК» в группе программ «Анализатор» и на рабочем столе

3.3 Включение

Включить устройство. Для этого установить кнопку 5 на задней стенке теплового блока в положение «ВКЛ». При этом должен быть слышан характерный негромкий звук, должен загореться левый светодиод на лицевой панели теплового блока, и на табло теплового блока должна высветиться надпись:

ИАП РАН
МГТУ им. Баумана
ЗАО «Синтол»
представляют ...

Через несколько секунд должна появиться другая надпись:

Анализатор
нуклеиновых кислот
АНК-16 (32 или 96)
S/N: XXXXXX

Внимание!

Для прогрева устройства требуется не менее 30 минут.

4. Работа

4.1. Установка образцов

Для установки образцов необходимо выполнить следующие действия:

1. Вращая против часовой стрелки ручку (3), расположенную на крышке оптического блока (см. рисунок 1), приподнять тепловую крышку.
2. Повернуть защелку (4), расположенную слева от оптического блока, на 90° от себя.
3. Отодвинуть оптический блок по направляющим от себя до упора.
4. Вставить пробирки в лунки теплового блока. При постановке пробирок номера их позиции приведены на рисунке 4.1.1.

25	26	27	28	29	30	31	32
17	18	19	20	21	22	23	24
9	10	11	12	13	14	15	16
1	2	3	4	5	6	7	8

Рисунок 4.1.1

Пробирки должны быть плотно закрыты крышками, при этом выступы пробирок не должны накладываться друг на друга. Рекомендованное положение пробирок приведено на рисунке 4.1.2.

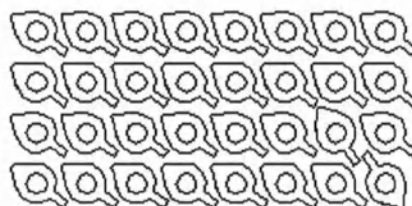


Рисунок 4.1.2

Если количество пробирок меньше чем количество лунок теплового блока, рекомендуется их ставить по порядку 1, 2, 3 и т.д. При этом в свободные угловые лунки 4, 13 и 16 добавить пустые пробирки.

Вернуть оптический блок в исходное состояние. Для этого сдвинуть оптический блок по направляющим к себе до упора, опустить тепловую крышку и зафиксировать защелку (4), расположенную слева от оптического блока, повернув ее на 90° к себе.

Внимание!

Процедуру прижима тепловой крышки производить до момента пропадания сопротивления при вращении ручки.

Дальнейшие попытки вращения ручки могут привести к выходу тепловой крышки из строя.

4.2. Выбор режима работы

Запустить программу «ANK.exe». На экране монитора появится окно главного меню "Программа для ПЦР".

На экране компьютера должно появиться окно:

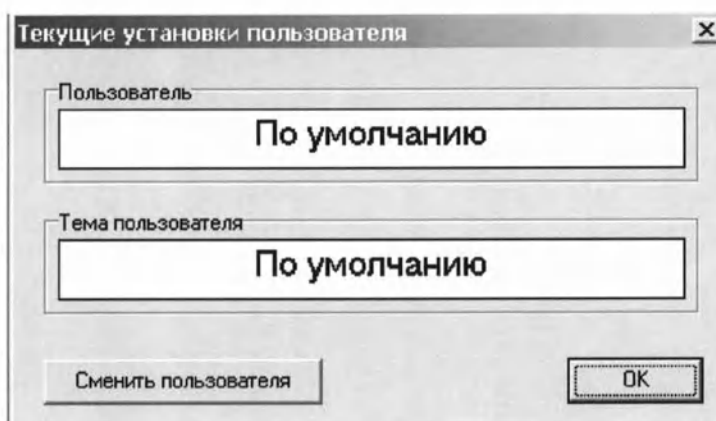


Рисунок 4.2.1

Для продолжения работы следует щёлкнуть по клавише «ОК». Если прибор эксплуатируется двумя или более пользователями и каждый из пользователей работает в нескольких направлениях, то для удобства рекомендуется создать «Текущие установки пользователя». Для этого следует щёлкнуть по клавише «Сменить пользователя».

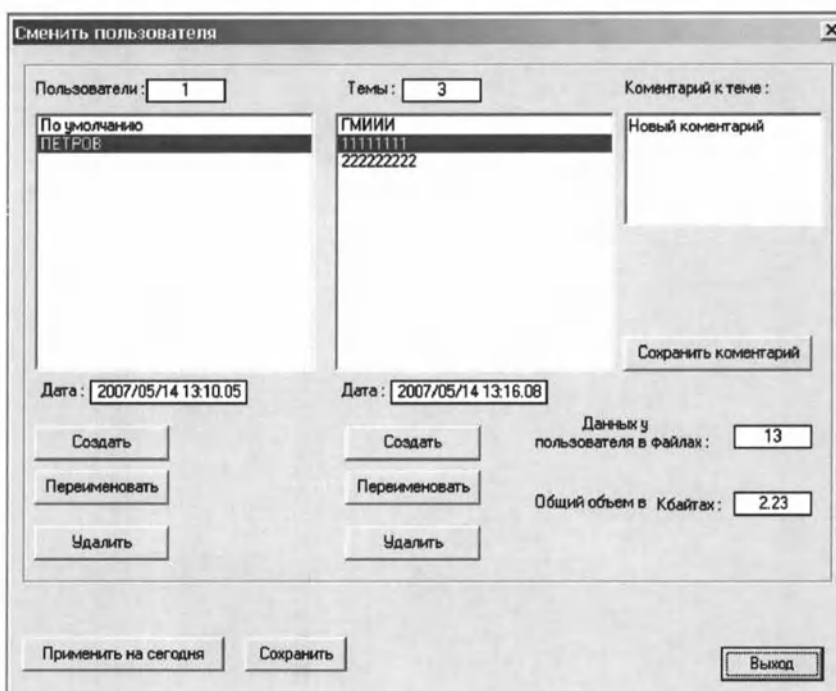


Рисунок 4.2.2

В появившемся окне (рисунок 4.2.2) следует заполнить требуемые опции и щёлкнуть по клавише «Сохранить». В дальнейшем после запуска программы в данном окне выбрать пользователя и соответствующую тему и щёлкнуть по клавише «Применить на сегодня».

В окне «Главного меню» программы (рисунок 4.2.3) выбрать «Режимы работы» щелчком левой кнопки мыши.

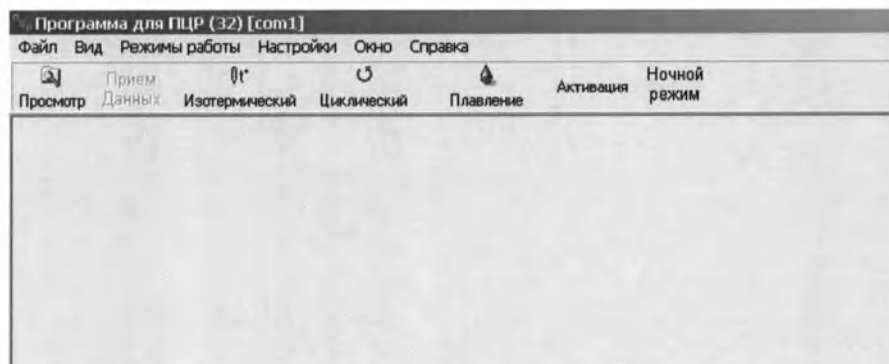


Рисунок 4.2.3

В предложенном меню выбрать режим работы:
«Постоянная температура» («горячая клавиша» F6);
«Циклический» («горячая клавиша» F7);
«Плавнение» («горячая клавиша» F8).

Режим работы определяет алгоритм работы теплового блока и алгоритм обработки результатов измерений.

4.3 Редактирование режима работы

При выборе режима работы на дисплее появляется диалог с таблицей заданного режима работы теплового блока и кнопками, позволяющими редактировать таблицу. Набор параметров для таблицы зависит от режима работы. Строка таблицы определяет степень работы теплового блока: температуру и время удержания заданной температуры. В циклическом режиме работы необходимо указать число циклов и блок ступеней, которые будут отрабатываться в цикле. В режиме плавления допустима только одна ступень. Редактирование каждого режима работы описано в соответствующем разделе описания режима работы.

4.4.Выбор красителей

В каждом диалоговом окне режима работы расположена клавиша «Красители». Под «красителем» понимается выбор канала регистрации, соответствующего данному красителю. Для каждого режима работы используется индивидуальная установка конфигурации красителей.

Щёлкнуть мышью по клавише «Красители». На экране появится соответствующее окно (рисунок 4.4.1).

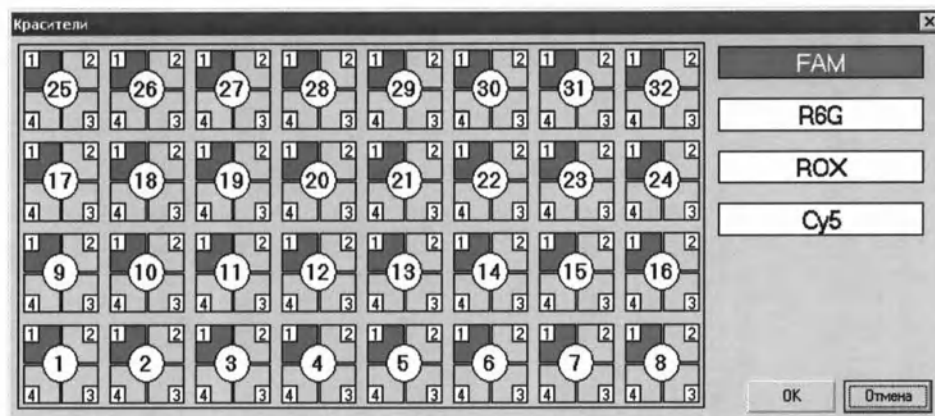


Рисунок 4.4.1

Окно имеет ячейки, соответствующие по расположению и нумерации лункам для пробирок теплового блока.

Каждая ячейка, в свою очередь, разбита на четыре части, соответствующие четырем красителям и соответствующим парам интерференционных светофильтров со следующими максимумами пропускания.

Краситель	Длина волны возбуждения (нм)	Длина волны флуоресценции (нм)
<i>FAM</i>	495	520
<i>R6G</i>	530	570
<i>ROX</i>	585	630
<i>Cy5</i>	635	695

Для смены названия красителя щёлкнуть правой кнопкой мыши по кнопке с выбранным красителем. Появится список красителей, применяемых в данной области спектра.

Активация кнопки с красителем устанавливает сбор и отображение информации по этому красителю во всех ячейках.

Активация номера ячейки в белом кружке устанавливает сбор и отображение информации по всем красителям в данной ячейке.

В каждой ячейке можно установить индивидуальный выбор красителей, активировав квадратные кнопки с номерами соответствующих красителей.

После заполнения нажать кнопку «OK».

4.5 Ввод сведений об образцах

В каждом диалоговом окне режима работы расположена клавиша «Сведения об образцах», которые позволяют указать тип образца установленного в каждой лунке для каждого красителя.

Нажать клавишу «Сведения об образцах». В появившемся окне сделать отметки о каждом образце по всем активным красителям.

Рисунок 4.5.1

Выбрать тип образца в правом верхнем окне.

4.5.1 Расшифровка сокращенных обозначений

ИО - исследуемый образец;
ОКО - отрицательный контрольный образец;
ПКО - положительный контрольный образец;
ВПК - внутренний положительный контроль;
КВПК - калибровка внутреннего положительного контроля;
КО ? - калибровочный образец.

Отметить тип образца в окне под кнопкой "Задать" и нажать эту кнопку.

Набрать название образца в поле "Название или номер" и нажать кнопку "Задать".

Для ускорения ввода можно использовать отметку "Кратность" (число повторов образца) и кнопку "Задать".

Для повторения сведений об образцах по разным красителям следует пользоваться кнопками «Копировать» и «Вставить».

Кнопка "Очистить" сбрасывает введенные сведения.

По окончании ввода информации нажать клавишу «Применить и выйти».

Для выполнения качественного анализа необходимо задать сведения об образце ОКО.

Если предполагается выполнить количественный анализ необходимо пометить образцы, используемые для калибровки, шифром «КО ?» в столбце «Тип» и указать их концентрацию в графе «Название или номер». Результаты калибровки могут быть использованы при повторных количественных анализах.

4.5.2 Особенности ввода параметров калибровочного образца «КО ?»

Ввод параметров калибровочного образца «КО?» осуществляется путем выделения этого обозначения в окне под кнопкой "Задать". Окно "Сведения об образцах по красителям" приобретает следующий вид (рисунок 4.5.2)

Рисунок 4.5.2

Под заголовком "Как задать" выбирается "Степень" - показатель степени или "Число", определяющие относительную или абсолютную концентрацию образца.

Кнопкой «Кратность» выбирается количество образцов данной концентрации. Содержание граф таблицы "Тип образца", "Название или номер" выбирается из окна «K01...K09» и вводится кнопкой "Задать".

4.6 Сохранение и загрузка параметров режима работы

Совокупность параметров режима работы и выбранных красителей определяет метод работы. Для сохранения метода, нужно щелкнуть по клавише «Сохранить». На экране монитора появится окно «Сохранить метод» (рисунок 4.6.1). Оператор имеет возможность присвоить методу наименование, содержащее не менее 5 и не более 15 букв.

Сохранение нового метода производится для уже существующего «Пользователя» или одновременно с созданием нового «Пользователя». Оператор имеет возможность присвоить новому «Пользователю» имя, содержащее не менее 5 и не более 15 букв.

Для загрузки нужного метода нажать на клавишу «Загрузить». На экране монитора появится окно «Загрузить метод» (рисунок 4.6.2). Выделить нужного пользователя и нужный метод и щелкнуть по клавише «Загрузить». В этом же окне можно удалить ранее загруженный метод кнопкой «Удалить».

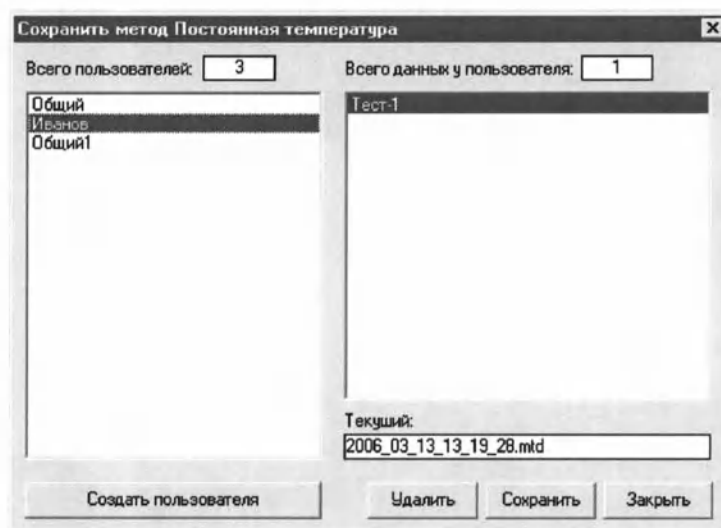


Рисунок 4.6.1

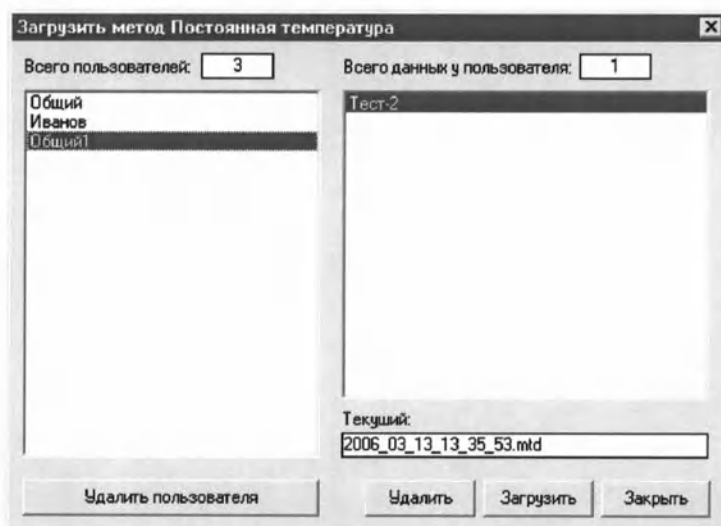


Рисунок 4.6.2

4.7 Запуск измерений

После выполнения подготовительных операций (редактирование таблицы, выбор красителей и сведения об образцах) осуществить запуск работы клавишей «Старт».

Прогресс индикатор показывает процесс конфигурации устройства согласно параметрам режима работы. По завершению конфигурации на экране появляется окно «Прием данных».

Если в момент старта температура термодержки достигла 90,5 °С, устройство начнёт работу по заданной программе.

В случае если температура не достигла этого значения, на экране появится окно (рисунок 4.7.1).



Рисунок 4.7.1

При достижении температуры термодержки 90,5 °С, устройство выходит в окно «Прием данных» и начнёт работу по заданной программе.

Для принудительного запуска программы, не дожидаясь нагрева тепловой крышки, щёлкнуть по клавише «Продолжить».

Если тепловая крышка прибора не опущена, то на экране монитора появится предупреждение (рисунок 4.7.2).

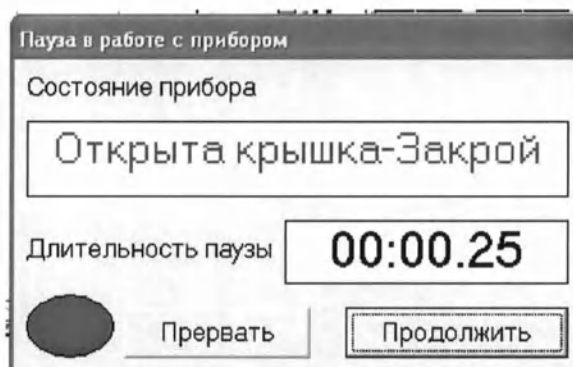


Рисунок 4.7.2

Для продолжения работы следует опустить тепловую крышку в соответствии с п.4.1. настоящего руководства и щёлкнуть по клавише «Продолжить».

4.8 Прием данных

После нажатия клавиши «Старт» устройство работает по заданной программе. На экране появляется окно приема данных (рисунок 4.8.1).

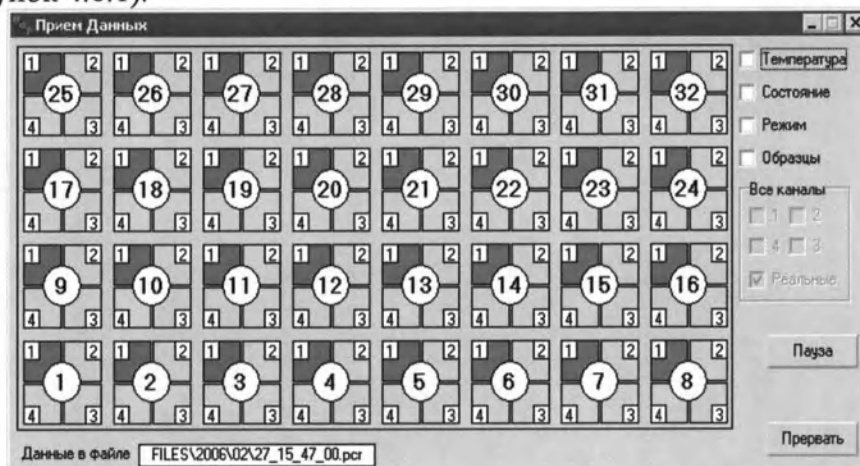


Рисунок 4.8.1

Путем нажатия соответствующих клавиш можно наблюдать на экране текущую информацию о работе.

При установке флажка «Температура» отображается график отработки заданного температурного режима R_S – температура ($^{\circ}\text{C}$) как функция времени (t сек).

При установке флажка «Состояние» отображается текущее время и температура крышки.

При установке флажка «Режим» отображается соответственно таблица ступеней режима работы теплового блока.

При установке флажка «Реальные» нажатием соответствующих номеров каналов, расположенных под надписью «Все каналы», на экран выводятся графики интенсивности флуоресценции всех пробирок для выбранного красителя. Щелчком мыши по квадрату канала в любой ячейке в окне «Прием данных» выводится **подробная информация** по пробирке в этой ячейке в процессе работы (рисунок 4.8.2).

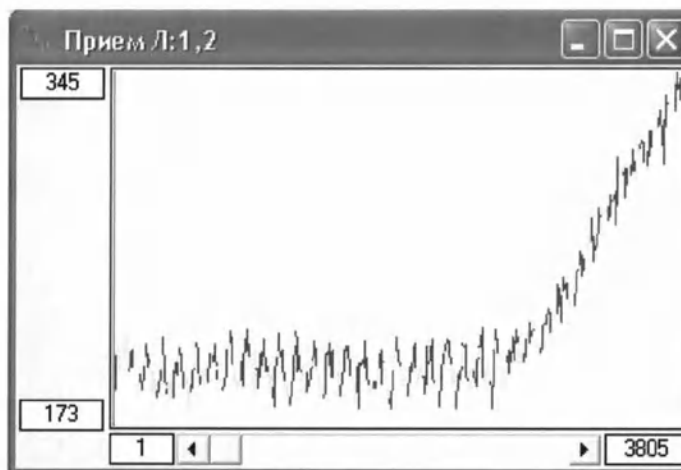


Рисунок 4.8.2

Программа позволяет получить цифровое значение нужной точки любого графика, а также выделять нужные участки графиков: вертикальная ось – «Флуоресценция, относительные единицы», горизонтальная ось – «Номер отсчета».

Программа позволяет наблюдать ход реакции во всех пробирках одновременно. После того, как будет получено достаточно данных и высветится квадрат у соответствующего канала регистрации в поле «все каналы». Щелчком по соответствующему каналу на экран выводятся реальные графики интенсивности флуоресценции всех пробирок для выбранного красителя. (рисунок 4.8.3) Вертикальная ось – «Флуоресценция, относительные единицы», горизонтальная ось – «Номер цикла».

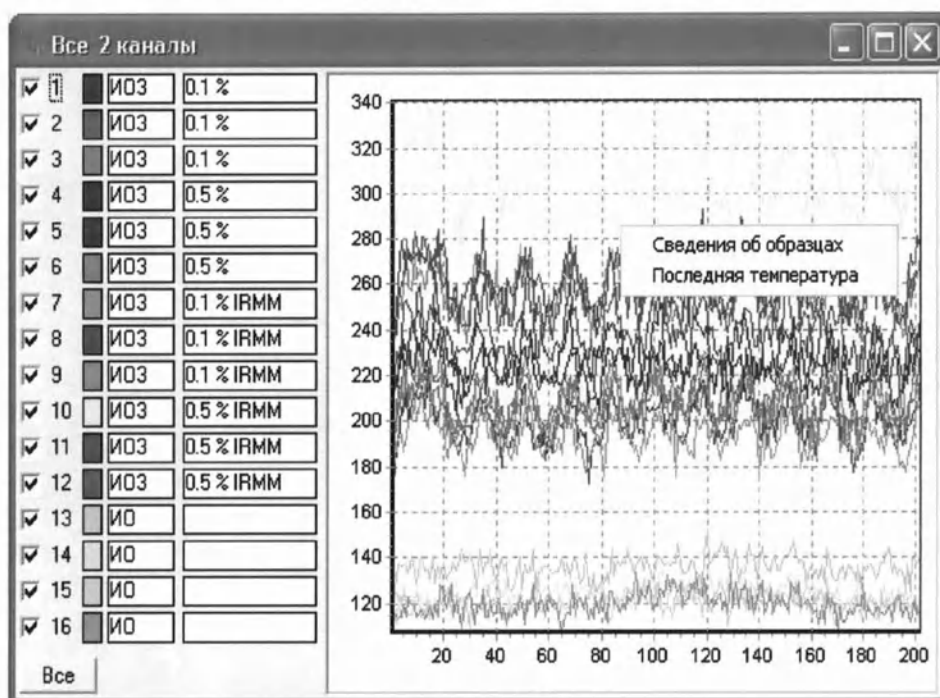


Рисунок 4.8.3

Правой кнопкой мыши можно вывести информацию об образцах и последней температуре.

Ставя или убирая галочки напротив определенных ячеек, можно регулировать количество видимых ячеек.

Однократным щелчком левой кнопки мыши по цветному квадрату, соответствующему какому-либо образцу, график этого образца выделяется утолщенной линией. Двойной щелчок левой кнопки мыши оставляет на рисунке график флуоресценции только этой ячейки.

Кнопка «Все» активирует графики флуоресценции всех ячеек: вертикальная ось – «Флуоресценция, относительные единицы», горизонтальная ось – «Номер отсчета».

Кнопка «Пауза» дает возможность остановить процесс и повторно запустить его.

После седьмого цикла есть возможность просмотреть огибающую сигнала флуоресценции. Для этого необходимо снять флажок «Реальные» и нажать соответствующий номер канала в поле «Все каналы». На экран выводятся графики интенсивности флуоресценции всех пробирок для выбранного красителя в режиме «одна точка за цикл». Вертикальная ось – «Флуоресценция, относительные единицы», горизонтальная ось – «Номер цикла».

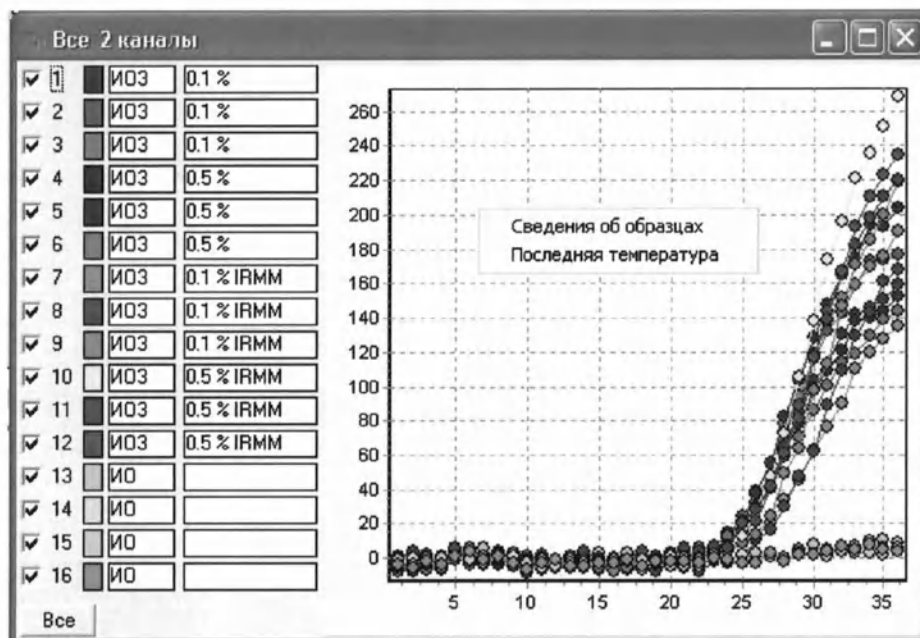


Рисунок 4.8.4

При выполнении заданного режима работы можно наблюдать на экране индикаторного табло теплового блока информацию об отработке заданного теплового режима и количестве отработанных циклов.

Правый светодиод на лицевой панели теплового блока индицирует тепловой режим теплового блока в текущий момент времени: красный цвет – нагрев, зеленый – охлаждение.

После выполнения заданной программы полученная информация запоминается автоматически в виде файла. Устройство переходит в режим ожидания «HOLD», который характеризуется пониженной температурой теплового блока (25 °C).

Прерывание выполнения программы

Кнопка «Выход» обеспечивает принудительное завершение выполнения режима. Результаты сохраняются в виде файла при времени работы более 10 минут (это ограничение не распространяется на режим «Плавление»).

4.9 Режим *HOLD*

После окончания работы по указанной в режиме работы таблице устройство переходит в режим *HOLD*. Режим *HOLD* предназначен для сохранения результатов реакции после проведения измерений и для безопасного извлечения пробирок из устройства.

При успешном завершении измерений вид экрана приведен на рисунке 4.9.1

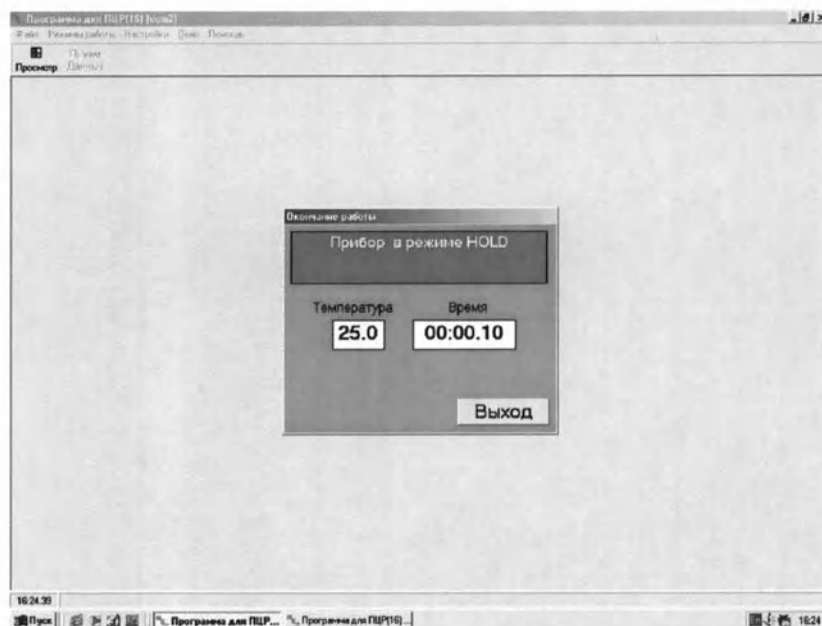


Рисунок 4.9.1

Кнопка «Выход» окончательно выключает тепловой блок, выключая режим *HOLD*.

Настройки режима *HOLD* будут приведены в главе «Настройка».

4.10 Просмотр результатов

Для просмотра ранее полученных файлов нажать опцию «Просмотр» в «Главном окне». Нужный файл находится по системе: «год» – «месяц» – «число» – «часы, минуты» (рисунок 4.10.1).

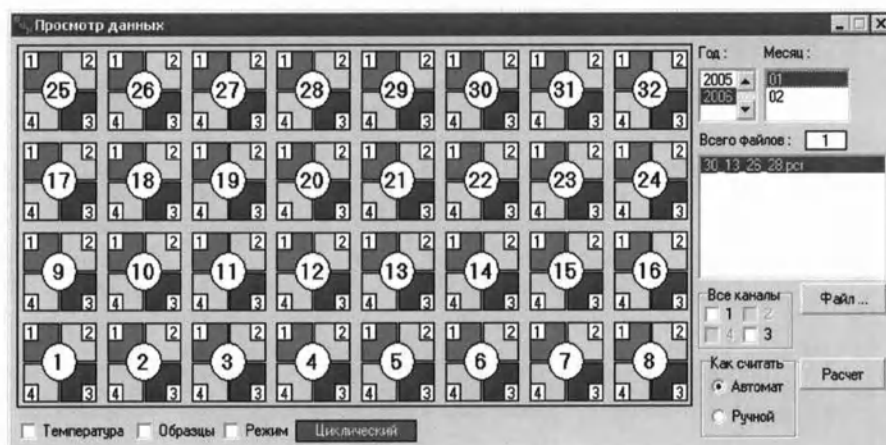


Рисунок 4.10.1

Активируя опции «Температура», «Образцы» и «Режим» в окне «Просмотр данных», можно получить информацию соответственно о температуре, использованных образцах и режиме работы.

Нажав мышью на соответствующую ячейку, можно получить информацию об интенсивности флуоресценции в любой из пробирок для любого красителя (рисунок 4.10.2).

Вертикальная ось – «Флуоресценция, относительные единицы», горизонтальная ось – «Номер отсчета».



Рисунок 4.10.2

Посмотреть информацию по всем ячейкам можно, активировав соответствующий номер канала в окне «Просмотр данных». Вертикальная ось – «Флуоресценция, относительные единицы», горизонтальная ось – «Номер отсчета».

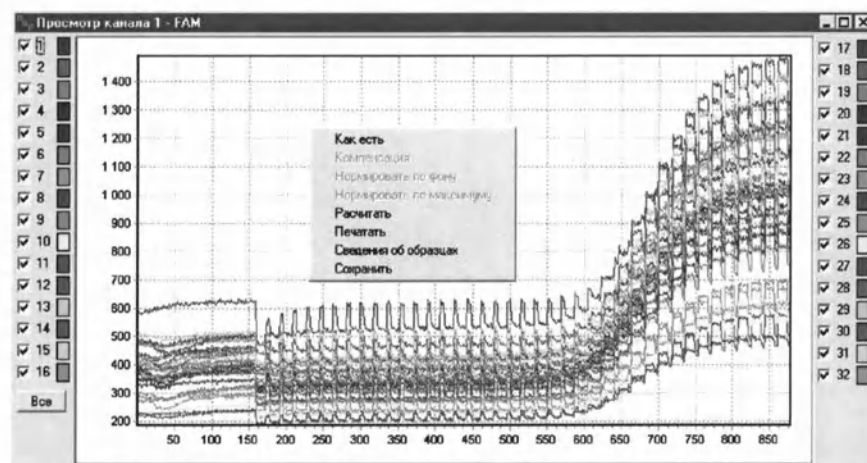


Рисунок 4.10.3

Правой кнопкой мыши можно:

- опцией «Как есть» отобразить усредненные кривые.
- опцией «Нормировать по фону» привести кривые к общему фону.
- опцией «Нормировать по максимуму» нормировать все кривые к 1.
- опцией «Рассчитать» определить пороговый цикл.
- опцией «Печатать» вывести на печать полученную картинку.
- опцией «Сведения об образцах» добавить на график информацию об образцах.

Ставя или убирая галочки напротив определенных ячеек, можно регулировать количество видимых кривых. Однократным щелчком левой кнопки мыши по цветному квадрату, соответствующему какому-либо образцу, его график выделяется утолщенной линией. Двойной щелчок левой кнопки мыши оставляет на рисунке график флуоресценции только этой ячейки.

Кнопка «Все» активирует графики флуоресценции всех ячеек.

4.11. Данные с флэш-памяти

Этот режим сохранения и просмотра полученных данных позволяет сохранить результаты эксперимента в случае «зависания» компьютера или потери связи между прибором и компьютером в процессе выполнения программы. В памяти прибора всегда сохраняются данные последней выполненной программы работы.

Для получения и просмотра этих данных следует выбрать «Режимы работы» - «Данные с флэш-памяти».

На экране должно появиться окно (рисунок 4.11.1).

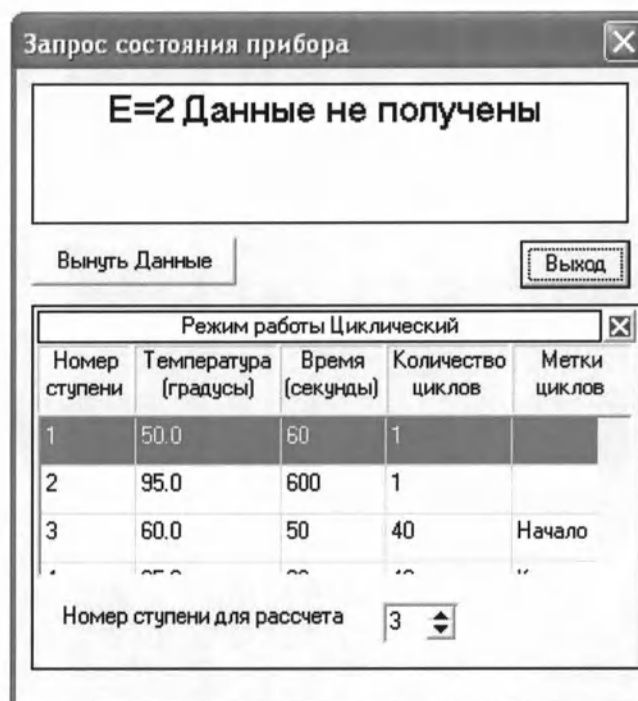


Рисунок 4.11.1

Запустить процесс получения данных, выбрав клавишу «Вынуть данные». Эта процедура длится до 5 мин и её продолжительность зависит от величины файла.

При успешном завершении на экране должно появиться окно (рисунок 4.11.2).



Рисунок 4.11.2

Для просмотра полученного файла нажать опцию «Просмотр» в «Главном окне». Файл сохранится с датой и временем выполнения процедуры получения файла из флэш-памяти.

5 Работа в режиме «Постоянная температура»

Режим «Постоянная температура» используется в основном для настройки и тестирования устройства. В этом режиме могут быть заданы несколько ступеней, отличающихся температурой и временем исполнения. Число ступеней не должно превышать 50.

В диалоговом окне «Постоянная температура» (рисунок 5.1) кнопками "Удалить" и "Добавить" задать нужное количество ступеней, которые будут выполняться последовательно.



Рисунок 5.1

Для изменения параметров ступени выделить нужную строку щелчком мыши, поменять параметры и нажать клавишу «Заменить».

Для удаления ступени используется кнопка «Удалить».

Для добавления ступени в конец таблицы или вставки ступени в середину таблицы установить значения «Температура» и «Время» ступени, используя стрелки или курсор в правой части окна с параметрами, и нажать кнопку «Добавить».

Для изменения ступени выделить нужную строку щелчком мыши, поменять параметры и нажать клавишу «Заменить».

Выбрать красители согласно пункту 4.4.

Задать сведения об образцах согласно пункту 4.5.

После выполнения подготовительных операций осуществить запуск работы клавишей «Старт».

5.1 Контроль работы с помощью табло теплового блока

Табло на передней панели теплового блока позволяет получить следующую информацию:

ТЕРМОСТАТ
30.0 -> 28.7 ^^^
N: 1 T: 99:40
Осталось: 04:59:51 где:

- ТЕРМОСТАТ – означает работу в режиме постоянной температуры;

- 30.0 - заданная температура ступени;

→ 28.7 текущая температура ступени;

- ^^^ - обозначение переходного режима в направлении увеличения температуры;

- vvv - обозначение переходного режима в направлении уменьшения температуры;

- =1= - обозначение режима стабилизации температуры, цифра означает номер строки в программе (ступени);

- N: 1 - номер цикла при отработке циклограммы;

- T: 99:40 - время выполнения ступени;

- Осталось: 04:59:51 – общее время до завершения программы.

Если в программе была нажата кнопка «ПАУЗА», то на табло будет выведено:

ТЕРМОСТАТ
30.0 -> 30.0 =1=
<< ПАУЗА >>
Осталось: 00:12:42

При этом останавливается отсчет времени до тех пор, пока не будет нажата кнопка «ПРОДОЛЖИТЬ» в программе на компьютере.

Если при работе была открыта тепловая крышка, на табло будет выведено:

ТЕРМОСТАТ
30.0 -> 30.0 =1=
<< ОТКРЫТА КРЫШКА >>
Осталось: 00:12:42

Продолжение работы возможно только при закрытой крышке и после того, как будет нажата кнопка «ПРОДОЛЖИТЬ».

После окончания программы устройство переходит в режим HOLD, на табло будет выведено:

ТЕРМОСТАТ
25.0 -> 28.0 vvv
<< Окончание работы >>
Время: 00:00:25

При этом тепловой блок охлаждается до температуры HOLD (обычно 25°C). Отсчет времени ведется по нарастающей последовательности. При достижении температуры HOLD, на табло будет выведено:

ТЕРМОСТАТ
25.0 -> 25.0 ==
<<Режим HOLD >>
Время: 00:09:10

6 Работа в режиме «Циклический»

Режим «Циклический» используется для обеспечения условий ПЦР и наблюдения сигналов флуоресценции. В этом режиме могут быть заданы несколько ступеней, которые будут выполняться в цикле, отличающихся температурой и временем исполнения, а также количество циклов.

В окне «Главного меню программы» щелчком левой кнопки мыши выбрать «Режимы работы» и далее выбрать режим «Циклический» (или «горячей клавишей» F7).

В появившемся окне (рисунок 6.1) задать программу работы теплового блока.

Номер ступени	Температура (градусы)	Время (секунды)	Количество циклов	Метки циклов
1	50.0	60	1	
2	95.0	600	1	
3	60.0	50	40	Начало
4	95.0	20	40	Конец

Рисунок 6.1

Для изменения параметров ступени выделить нужную строку щелчком мыши, поменять параметры и нажать клавишу «Заменить».

Для удаления ступени используется кнопка «Удалить».

Для добавления ступени в конец таблицы или вставки ступени в середину таблицы установить значения «Температура» и «Время» ступени, используя стрелки или курсор в правой части окна с параметрами, и нажать кнопку «Добавить» или «Вставить».

Для изменения ступени выделить нужную строку щелчком мыши, поменять параметры и нажать клавишу «Заменить».

Внимание!

Для 16-канального прибора устанавливаемое время ступени не должна быть менее:

- 3 секунд при измерении в одном цвете,
- 6 секунд при измерении в двухцветном режиме,
- 9 секунд при работе в трёхцветном режиме,
- 12 секунд при работе в четырёхцветном режиме.

Для 32-канального:

соответственно-6, 10, 14, 18 секунд.

Кнопкой «Установить параметры циклов» внести информацию о номере ступени начала, конца и количестве циклов в открывшемся окне (рисунок 6.2).

Рисунок 6.2

Выбрать красители согласно пункту 4.4. Только после выбора красителей будет доступна клавиша «Сведения об образцах».

Задать сведения об образцах согласно пункту 4.5. Только после указания сведений об образцах будет доступна клавиша «Старт».

После выполнения подготовительных операций осуществить запуск работы клавишей «Старт».

Для запоминания набранных параметров использовать функцию «Сохранить», для загрузки ранее сохраненного метода – «Загрузить» (подробнее см. пункт 4.6).

6.1 Контроль работы с помощью табло теплового блока

Табло на передней панели теплового блока позволяет получить следующую информацию:

ЦИКЛОГРАММА
94.0 -> 69.7 ^^^
N: 2 T: 06:40
Осталось: 00:17:06

где:

- ЦИКЛОГРАММА – означает работу в циклическом режиме;
- 94.0 - заданная температура ступени;
- > 69.7 текущая температура ступени;
- ^^^ - обозначение переходного режима в направлении увеличения температуры;
- vvv - обозначение переходного режима в направлении уменьшения температуры;
- =1= -обозначение режима стабилизации температуры, цифра означает номер строки в программе (ступени);
- N: 1 - номер цикла при отработке циклограммы;
- T: 06:40 - время выполнения ступени;
- Осталось: 00:17:06 – общее время до завершения программы.

Если в программе была нажата кнопка «ПАУЗА», то на табло будет выведено:

ЦИКЛОГРАММА
94.0 -> 94.0 =1=
<< ПАУЗА >>
Осталось: 00:12:42

При этом останавливается отсчет времени до тех пор, пока не будет нажата кнопка ПРОДОЛЖИТЬ в программе на компьютере.

Если при работе была открыта тепловая крышка, на табло будет выведено:

ЦИКЛОГРАММА
94.0 -> 94.0 =1=
<< ОТКРЫТА КРЫШКА >>
Осталось: 00:12:42

Продолжение работы возможно только при закрытой крышке и после того, как будет нажата кнопка ПРОДОЛЖИТЬ в программе на компьютере.

После окончания программы тепловой блок переходит в режим HOLD, на табло будет выведено:

ЦИКЛОГРАММА
25.0 -> 84.0 vvv
<< Окончание работы >>
Время: 00:00:25

При этом тепловой блок охлаждается до температуры HOLD (обычно 25°C). Отсчет времени ведется по нарастающей последовательности. При достижении температуры HOLD, на табло будет выведено:

ЦИКЛОГРАММА
25.0 -> 25.0 ===
<<Режим HOLD >>
Время: 00:09:10

7 Обработка результатов в режиме «Циклический»

7.1 Определение порогового цикла

Автоматический способ

Обработка результатов может выполняться с целью определения порогового цикла, выполнения качественного или количественного анализа.

Определение порогового цикла может осуществляться тремя способами: автоматическим, ручным и пороговым (Threshold). Для большинства случаев рекомендуется автоматический способ. Применение ручного способа целесообразно при измерении пороговых значений концентраций, а также для обработки результатов при непосредственном участии оператора с возможностью коррекции алгоритма обработки.

Пороговый метод расчета может дать наилучшие результаты в случаях, когда при проведении эксперимента используются контрольные образцы с известной концентрацией.

Выполнить просмотр результатов согласно пункту 4.10. Для расчёта следует активизировать опцию «Автомат» в окне «Просмотр данных» и выбрать требуемый для расчёта канал, щёлкнув по номеру канала мышью. На экране монитора появится окно с графиками флуоресценции во всех 16 пробирках.

Нужно щёлкнуть правой клавишей мыши по полю графиков и выбрать в появившемся окне опцию «Расчитать». На экране появится окно «Расчёт автоматический» с результатами расчёта порогового цикла (рисунок 7.1.1). Вертикальная ось – «Флуоресценция, относительные единицы», горизонтальная ось – «Номер цикла».

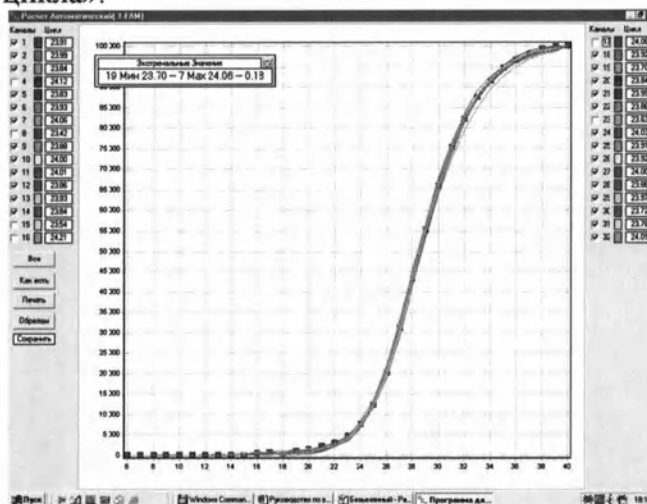


Рисунок 7.1.1

В окне заставки «Экстремальные значения» показаны минимальные и максимальные значения порогового цикла с соответствующими номерами пробирок, а так же разность между этими значениями, делённая пополам.

Полученные данные (исходные значения флуоресценции, нормализованные и рассчитанные пороговые циклы) можно сохранить, щёлкнув правой кнопкой мыши по клавише «Сохранить» и выбрав нужный параметр.

Ручной способ

Для проведения расчёта ручным способом следует активизировать опцию «Ручной» в окне «Просмотр данных» и выбрать требуемый для расчёта канал, щёлкнув по номеру канала мышью.

На экране монитора появится окно «Ручной режим (предварительно)» с результатами анализа кривых (рисунок 7.1.2). Вертикальная ось – «Флуоресценция, относительные единицы», горизонтальная ось – «Номер цикла».

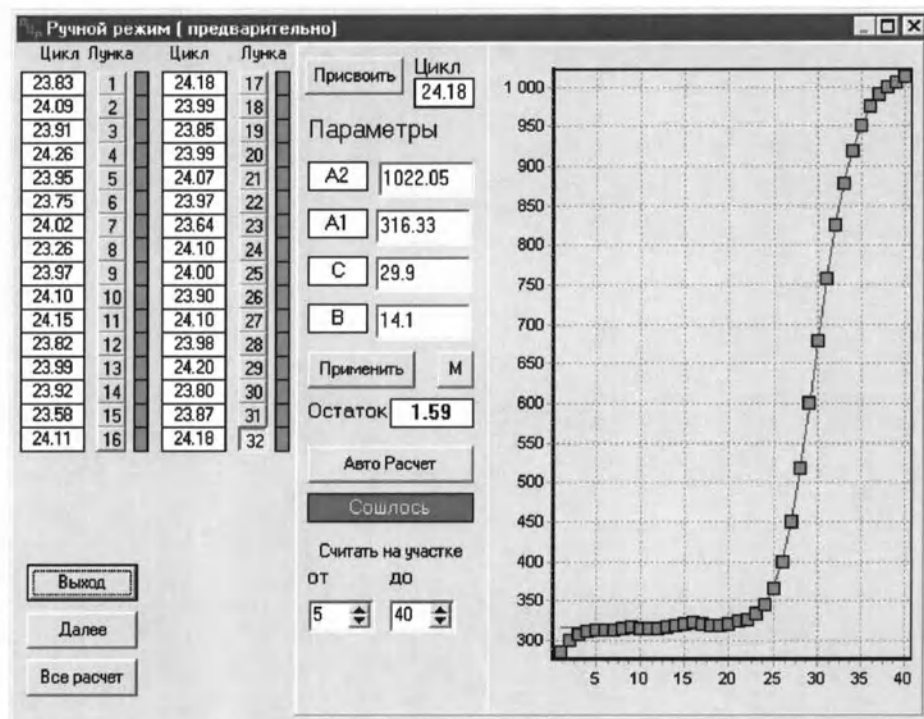


Рисунок 7.1.2

В этом окне справа зелеными точками отображается полученный график, а красной линией – график математической функции, наиболее точно отображающей реальную кривую.

A1, A2, C, B – параметры этой функции.

Здесь можно исключить из анализа выпадающие точки для отдельных ячеек или всех кривых и пересчитать пороговый цикл. Для расчёта следует нажать клавишу «Авторасчёт». Возможны три варианта результата расчётов, отображаемых в нижнем окне:

- «сошлось»,
- «не сошлось»,
- «ошибка».

Первый вариант указывает на хорошее совпадение двух графиков, и при нём не требуется дополнительных манипуляций. При втором варианте следует попытаться вручную подобрать параметры с целью добиться минимизации числа в графе «Остаток». При третьем варианте расчёт порогового цикла для данного графика невозможен.

Клавиша «М» служит для возвращения к варианту подбора параметров, дающих минимальный остаток.

После окончания вычислений порогового цикла для отдельных кривых нажать кнопку «Далее». Появится окно с параметрами пороговых циклов, по которым был произведён расчёт, и с соответствующими графиками.

Пороговый метод (Threshold)

Для проведения расчёта этим методом следует последовательно активизировать в окне «Просмотр» опции «Как есть», «Нормировать по фону», «Нормировать по максимуму».

Активизировать опцию «Линия ручная». На экране монитора появится окно (Рисунок 7.1.3).

Передвигая движок в окне «Линия ручная», можно изменять значение порога, используемое для определения порогового цикла. Подобрал нужное значение, щёлкнуть по клавише «Пробросить в расчёт».

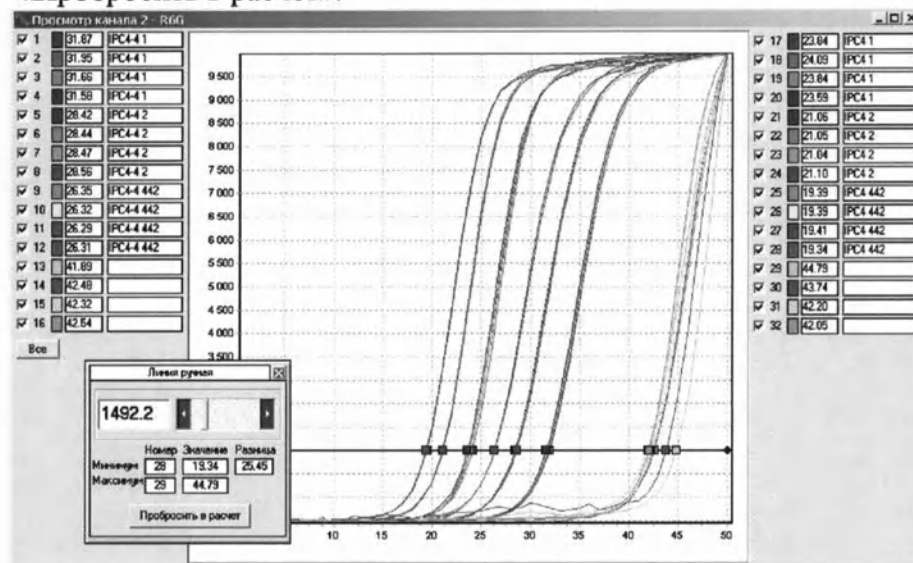


Рисунок 7.1.3

Сохранение результатов

Результаты расчетов можно сохранить в виде файла с расширением .txt или распечатать.

Результаты расчетов можно сохранить в буфере обмена в виде изображения экрана с помощью клавиши «Print Screen». Из буфера обмена изображение или его часть можно в программу «Word» двумя способами:

- вставить в виде рисунка непосредственно в «Word». Для выбора необходимой части изображения щёлкнуть правой кнопкой на поле рисунка, выбрать опцию «Формат рисунка» и при необходимости обрезать рисунок с разных сторон;

- вставить в виде рисунка в стандартную программу «Paint». Окном выделить нужную часть рисунка и скопировать. Выделенную часть рисунка вставить в «Word».

Этими двумя способами были вставлены рисунки в настоящее руководство.

7.2 Качественный анализ

Перед проведением измерений при запуске программы в окне «Образцы» пометить исследуемые и контрольные образцы соответствующим шифром в столбце «Тип» и при необходимости присвоить каждому из них дополнительный шифр в графе «Название или номер». Для проведения дальнейших вычислений необходимо указать значение отрицательного контрольного образца «ОКО».

После окончания программы измерений нужно произвести определение порогового цикла для исследуемых образцов ручным или автоматическим методом.

Качественный анализ по ОКО							
Номер лучки	Название или номер	Тип образца	Значение ПЦ	Результат ПЦР с учетом надежности (ПП)		Кратность	Комментарий
				95%	99%		
				37.57	0.00		
1	NOS	ОКО	38.17	-	-		
2	NOS	ОКО	41.00	-	-		
3	NOS-10e+2	ПКО	33.50	+	-		
4	NOS-10e+2	ПКО	33.86	+	-		
5	NOS-10e+4	ИО	26.39	+	-	+++	
6	NOS-10e+4	ИО	26.68	+	-	+++	
7	NOS-10e+6	ИО	19.39	+	-	++++	
8	NOS-10e+6	ИО	19.10	+	-	++++	
9	2	ИО	20.71	+	-	++++	
10	2	ИО	20.67	+	-	++++	
11	3	ИО	30.55	+	-	+	
12	3	ИО	27.50	+	-	++	
13	4	ИО	20.38	+	-	++++	
14	4	ИО	20.29	+	-	++++	
15	1	ИО	34.58	+	-	+	
16	1	ИО	31.92	+	-	+	

Выход

Печать

Рисунок 7.2.1

Щёлкнуть правой клавишей мыши по полю графиков и выбрать опцию «Качественный анализ». На экране монитора появится таблица с результатами измерений «Качественный анализ по ОКО».

7.3 Количественный анализ

Для проведения количественного анализа требуется построение калибровочной прямой.

Построение калибровочной прямой

- **Перед началом измерений** при наборе программы в окне «Образцы» пометить образцы, используемые для калибровки, шифром «КО» в столбце «Тип» и указать их концентрацию в графе «Название или номер». Пробирок с одинаковой концентрацией обычно должно быть несколько, так как это обеспечивает большую точность и воспроизводимость измерений.
- **После окончания программы** измерений нужно произвести определение порогового цикла для контрольных образцов ручным или автоматическим методом.
- Щёлкнуть правой клавишей мыши по полю графиков и выбрать опцию «Создать калибровку». На экране монитора появится окно «Создаём калибровку».

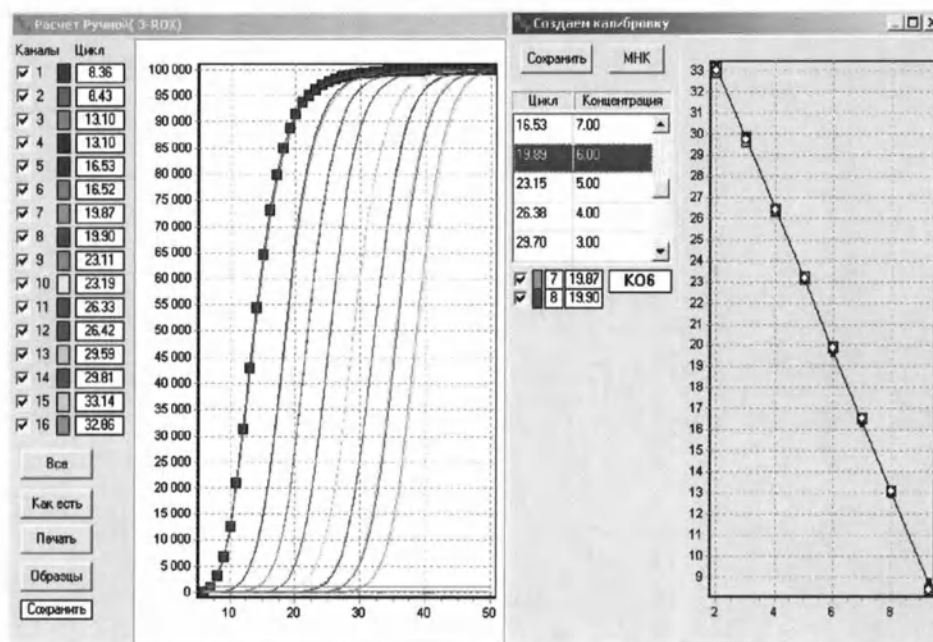


Рисунок 7.3.1

В этом окне представлены калибровочная прямая и данные, используемые для её построения.

Для получения более подробных сведений о калибровочной прямой нужно щёлкнуть мышью по клавише «МНК».

Для сохранения полученных калибровочных данных щёлкнуть по клавише «Сохранить» и в появившемся окне присвоить наименование (не менее пяти знаков).

Перед проведением измерений при наборе программы в окне «Образцы» пометить исследуемые образцы шифром «ИО» в столбце «Тип» и при необходимости присвоить каждому из них дополнительный шифр в графе «Название или номер».

1. После окончания программы измерений нужно произвести определение порогового цикла для исследуемых образцов ручным или автоматическим методом.

2. Щёлкнуть правой клавишей мыши по полю графиков и выбрать опцию «Рассчитать по калибровке». На экране монитора появится одноимённое окно.

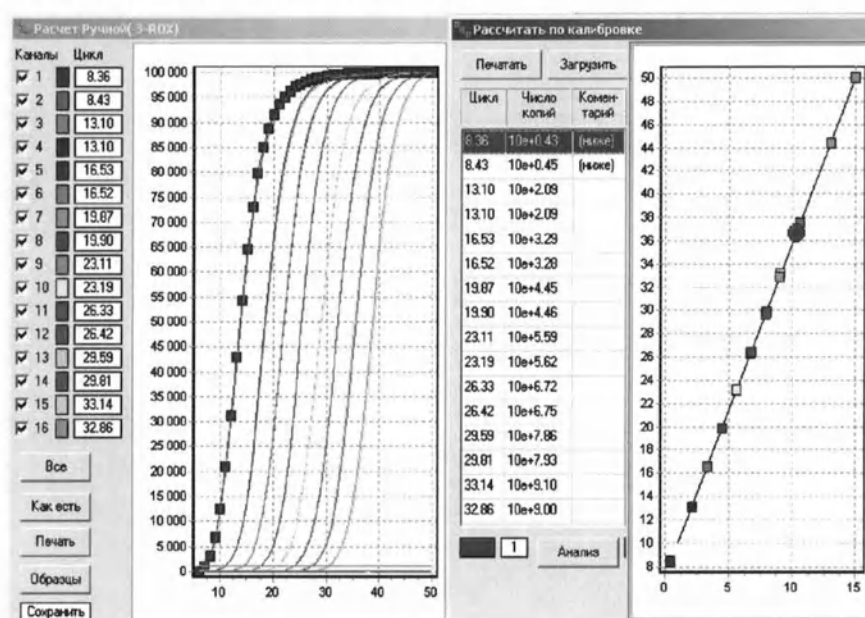


Рисунок 7.3.2

3. Для выбора калибровочной прямой, используемой для расчётов, щёлкнуть по клавише «Загрузить». После этого в таблице появятся значения концентраций исследуемых образцов, а в правой части окна - калибровочная прямая с точками, соответствующим этим образцам.

4. Для получения отчетного файла с итогами измерений нужно щёлкнуть по клавише «Анализ».

Отчетный файл можно сохранить и распечатать.

8 Работа в режиме «Плавнение»

Процедура «Плавнение» проводится обычно после проведения ПЦР с интеркалятором «SYBR Green I» для определения специфичности продуктов реакции.

В режиме «Плавнение» обеспечивается изменение температуры от начальной до конечной заданной температуры. Изменение температуры выполняется шагами с выдержкой после каждого шага (время на полке). Параметры этого режима заносятся в таблицу с помощью соответствующих кнопок и линеек прокрутки (рисунок 8.1). Изменение температуры может задаваться в сторону её увеличения или уменьшения.

В появившемся окне «Плавнение» задать программу работы теплового блока.

Номер ступени	Начальная температура (градусы)	Конечная температура (градусы)	Время на полке (секунды)	Шаг по температуре в (градусах до десятых)
1	50	95	15	0.5

Начальная температура: 50 [spinners]
Конечная температура: 95 [spinners]
Время: 15 [spinners]
Шаг: 0.5 [spinners]

Краситель: FAM, R6G, ROX, Cy5 [dropdown]
Температура HOLD: 30 [spinners]

Buttons: Заменить, Сведения об образцах..., Сохранить, Загрузить, Старт, Закрыть

Рисунок 8.1

Внести сведения об образцах аналогично п. 4.5.

Для запоминания набранных параметров использовать функцию «Сохранить», для загрузки ранее сохраненного метода – «Загрузить» (подробнее см. в пункте 4.6).

Начать работу нажатием кнопки «Старт».

8.1 Контроль работы с помощью табло теплового блока

Табло на передней панели теплового блока позволяет получить следующую информацию:

ПЛАВЛЕНИЕ
50.0 -> 46.7 ^ ^ ^
95.0 ++ 00.5 00:15
Осталось: 00:03

где:

- ПЛАВЛЕНИЕ – означает работу в режиме ПЛАВЛЕНИЕ;
- 50.0 - заданная начальная температура ступени;
- 95.0 - заданная конечная температура ступени;
- > 46.7 текущая температура ступени;
- ^^^ - обозначение переходного режима в направлении увеличения температуры;
- vvv - обозначение переходного режима в направлении уменьшения температуры;
- = = = - обозначение режима стабилизации температуры;
- 00.5 - номер цикла при отработке циклограммы;
- 00:15 - время на полке;
- Осталось: 00:17:06 – обратный отсчет время до завершения времени на полке.

Если в программе была нажата кнопка «ПАУЗА», то на табло будет выведено:

ПЛАВЛЕНИЕ
94.0 -> 94.0 =1=
<< ПАУЗА >>
Осталось: 00:12:42

При этом останавливается отсчет времени до тех пор, пока не будет нажата кнопка «ПРОДОЛЖИТЬ» в программе на компьютере.

Если при работе была открыта тепловая крышка, на табло будет выведено:

ПЛАВЛЕНИЕ
94.0 -> 94.0 =1=
<< ОТКРЫТА КРЫШКА >>
Осталось: 00:12:42

Продолжение работы возможно только при закрытой крышке и после того, как будет нажата кнопка «ПРОДОЛЖИТЬ».

После окончания программы тепловой блок переходит в режим HOLD, на табло будет выведено:

ПЛАВЛЕНИЕ
25.0 -> 84.0 vvv
<< Окончание работы >>
Время: 00:00:25

При этом тепловой блок охлаждается до температуры HOLD (обычно 25°C). Отсчет времени ведется по нарастающей последовательности. При достижении температуры HOLD, на табло будет выведено:

ПЛАВЛЕНИЕ
25.0 -> 25.0 ===
<<Режим HOLD >>
Время: 00:09:10

8.2 Обработка результатов

Открыть в окне «*Просмотр*» соответствующий файл.

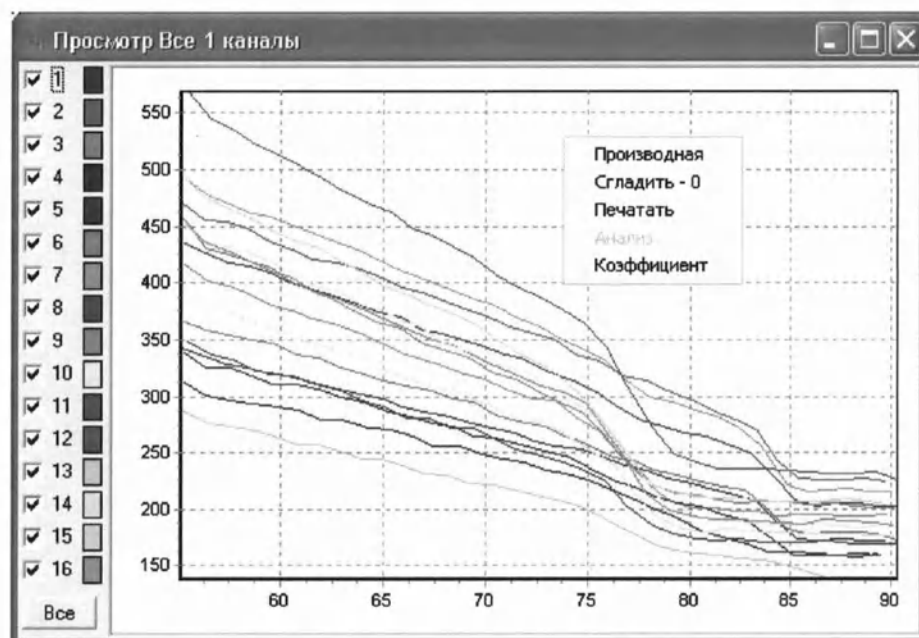


Рисунок 8.2

При необходимости можно сгладить полученные данные или выбрать другой температурный интервал для расчёта. Для этого следует щёлкнуть правой клавишей мыши по полю графиков и выбрать соответствующую опцию «*Сгладить*» или «*Коэффициент*».

Правой кнопкой мыши выбрать опцию «*Производная*». На экране монитора появятся графики первых производных от сигналов флуоресценции в координатах «температура»-«интенсивность».

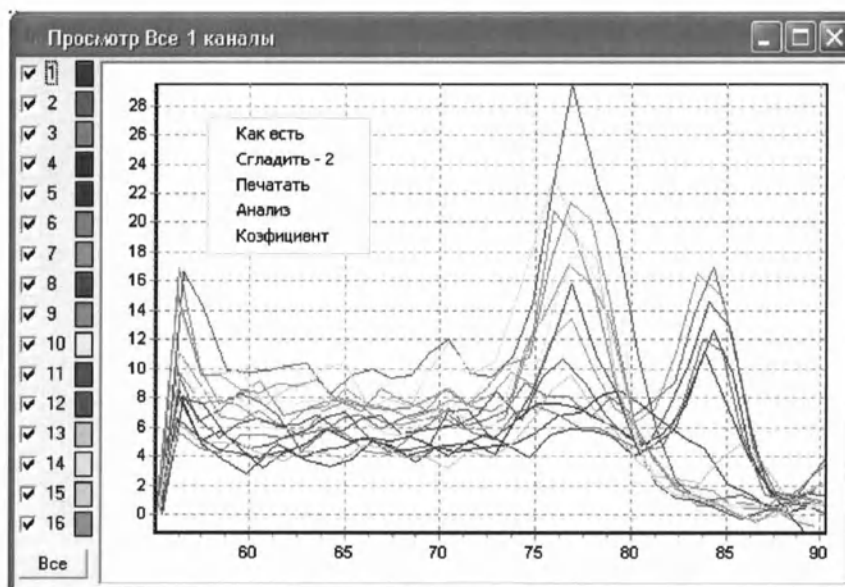


Рисунок 8.3

Для расчёта щёлкнуть правой клавишей мыши по полю графиков производных и выбрать опцию «Анализ», предварительно проведя процедуру сглаживания.

В появившемся на экране монитора окне установить температурный интервал и порог по амплитуде. После нажатия клавиши «Рассчитать», в таблице появятся данные по всем пикам, отвечающим установленным критериям. Данная процедура применима как к отдельно взятой пробе, так и ко всем пробам.

Данные режима Плавления

Номер Пики	Максимум по амплитуде	Температура в максимуме	Начало пика по температуре	Конец пика по температуре
Л8,1	14.61	84.13	62.14	83.14
Л8,2	14.61	84.13	62.14	88.14
Л9,1	20.75	75.91	62.14	83.14
Л9,2	20.75	75.91	62.14	88.14
Л10,1	23.05	77.82	62.14	83.14
Л10,2	23.05	77.82	62.14	88.14
Л11,1	15.86	76.90	62.14	83.14
Л11,2	15.86	76.90	62.14	88.14

Выход Печать Удалить

Амплитуда 14.03 Пик
Начало 62 Конец 88

Рассчитать

Рисунок 8.4

9 Настройка

Данная опция служит для изменения установленных режимов и параметров, выполняемых «по умолчанию».

Выбрать «Настройки» в окне «Главного меню».

Далее в этой главе приведены названия строк падающего меню и возможности при их активизации.

Название

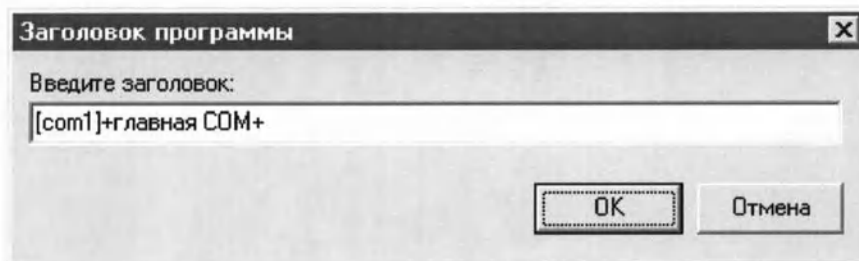


Рисунок 9.1

Для изменения заголовка программы следует набрать новое название и щёлкнуть по нужной клавише.

Расчёт

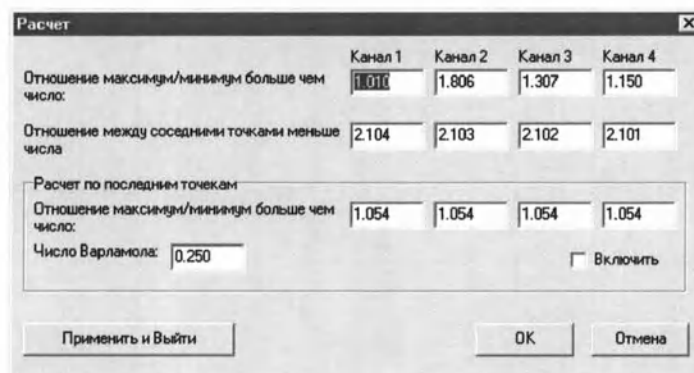


Рисунок 9.2

Выбрав данную опцию, можно изменить граничные условия, используемые при вычислении порогового цикла для каждого из четырёх каналов.

Термокрышка

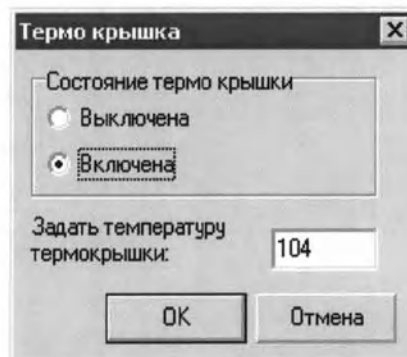


Рисунок 9.3

Выбрав данную опцию, можно активизировать одно из двух состояний термокрышки: «Включена» или «Выключена», и изменить её рабочую температуру.

Красители

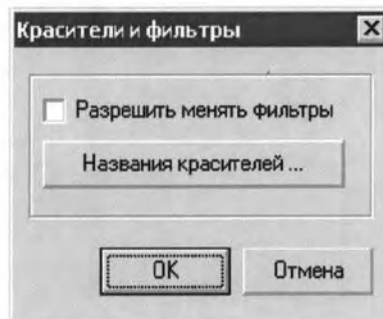


Рисунок 9.4

Выбрав данную опцию, можно изменить стандартную конфигурацию светофильтров, соответствующую определённым красителям.

Щёлкнуть по клавише «Название красителей».

Назначить имена красителей

Длины волн	Название
485/520	FAM,SGR1, 1-1
485/560	Первый 1-2
485/585	Первый 1-3
485/620	Первый 1-4
485/680	Первый 1-5
530/560	JOE,TET,HEX 2-2
530/585	TAMRA
530/620	Второй 2-4
530/670	Второй 2-5
550/585	ЗАПРЕЩЕНО
550/620	TAMRA
550/670	Третий 3-5
580/620	ROX,TEXAS 4-4
580/670	Четвертый 4-5
630/670	Cy5, LC640 5-5

Новое название

FAM,SGR1, 1-1

Заменить

OK

Отмена

Рисунок 9.5

Выбрать в столбце «Длины волн» нужную комбинацию светофильтров. Выделить мышью данную строку.

В графе «Новое название» набрать название нужного красителя и щёлкнуть по клавише «Заменить». При необходимости повторить аналогичные операции для других пар светофильтров. Щёлкнуть по клавише «ОК».

При необходимости применения нестандартной конфигурации светофильтров выбрать в общем меню режим работы, например «Циклический». В окне «Красители» щёлкнуть по клавише «Свободно».

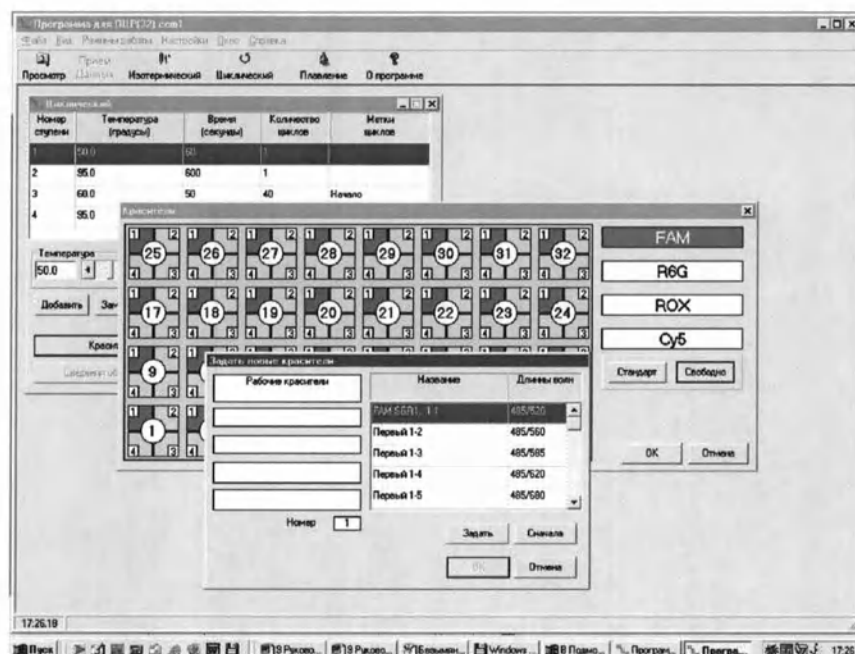


Рисунок 9.6

В появившемся окне «Задать новые красители» выделить мышью нужную строку и щёлкнуть по клавише «Задать». При необходимости задать аналогичным способом остальные красители. Щёлкнуть по клавише «OK».

Открыть окно «Просмотр канала 1 – FAM» для случая, когда образцы в разных ячейках были окрашены четырьмя красителями.

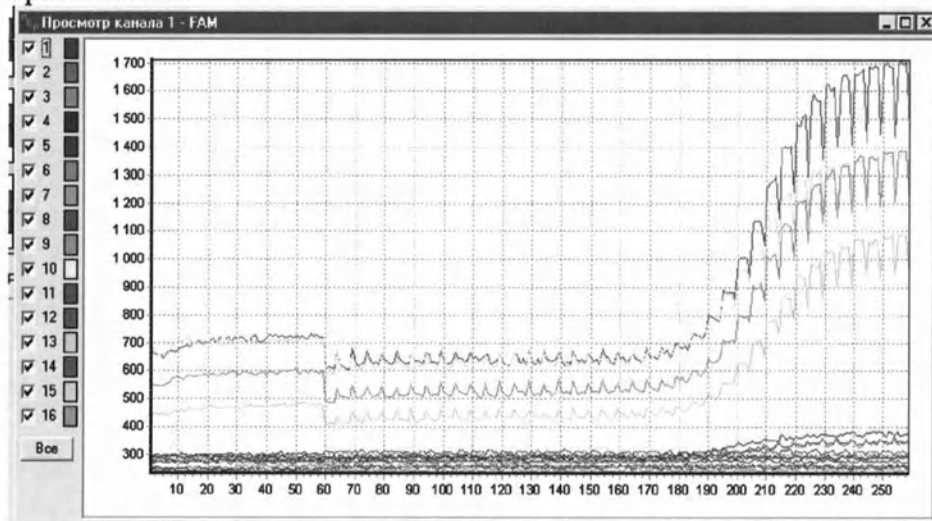


Рисунок 9.7

На рисунке 9.7 в нижней части окна видно нарастание сигнала от ячейки, в которой вместо красителя FAM присутствовал краситель R6G. Чтобы избежать ошибки и не принять это нарастание сигнала как положительный результат, в программе устройства имеется возможность компенсации ложных сигналов.

Компенсация

Открыть окно «Компенсация» в меню «Настройки». В этом окне (рисунок 9.8) можно задать три вида компенсации: матрица пересчета, нулевая линия и коэффициент усиления.

Матрица пересчета

Коэффициенты матрицы пересчета характеризуют прохождение сигналов каждого из четырех красителей в соседние каналы вследствие неидеальной избирательности светофильтров.

Цифрой 1 обозначена величина сигнала в основном канале, цифрой 0 – отсутствие прохождения сигнала соседнего канала. Величина коэффициента матрицы пересчета, равная 0,03, означает прохождение сигнала соседнего канала на уровне 3 %.

Компенсация

Матрица пересчета			
1	0.1	0	0
0	1	0.03	0
0	0	1	0
0	0	0	1

Определитель матрицы: 1.000000

☒ Включить матрицу в расчет

Нулевая линия	
Канал 1	0
Канал 2	0
Канал 3	0
Канал 4	0

☒ Включить в просмотр

Коэффициент усиления	
Канал 1	1
Канал 2	1
Канал 3	1
Канал 4	1

☒ Включить в просмотр

☒ Включить ручное среднее

Лунка: 1

Применить Сохранить Отмена

Рисунок 9.8

Если подобрать соответствующие коэффициенты, нажать клавишу «Сохранить» и отметить значком опцию «Включить матрицу в расчет», то при дальнейшей работе и при последующих открытиях окон «Просмотр канала 1 – FAM» и других, взаимное влияние красителей соседних каналов будет минимально.

В этом же окне можно выполнить коррекцию нулевой линии и коэффициентов усиления, однако, эту коррекцию делать не обязательно, поскольку эта операция выполняется при расчете порогового цикла автоматически.

Нулевая линия

Коррекция нулевой линии и коэффициентов усиления может быть полезна для дальнейшего использования графиков в технических отчетах и статьях.

В окне «Компенсация» отметить значком опцию «Включить ручное среднее». Открыть окно «Просмотр канала». Правой кнопкой нажать на поле открытого окна, в результате откроется меню, показанное на рисунке 9.9.

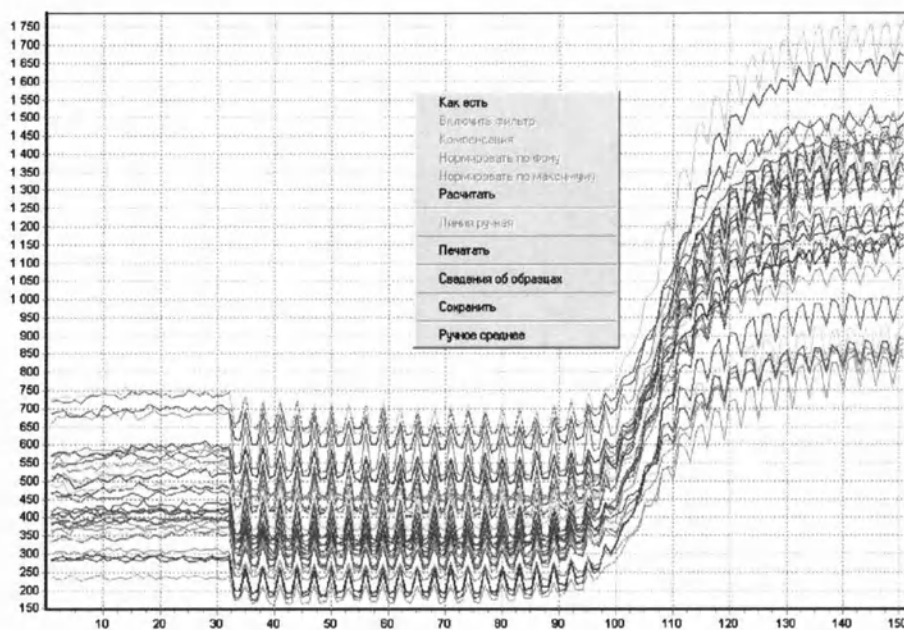


Рисунок 9.9

Преобразовать графики для оцифровки горизонтальной оси в масштабе 1 отсчет на 1 цикл. Для этого выполнить операцию «Как есть».

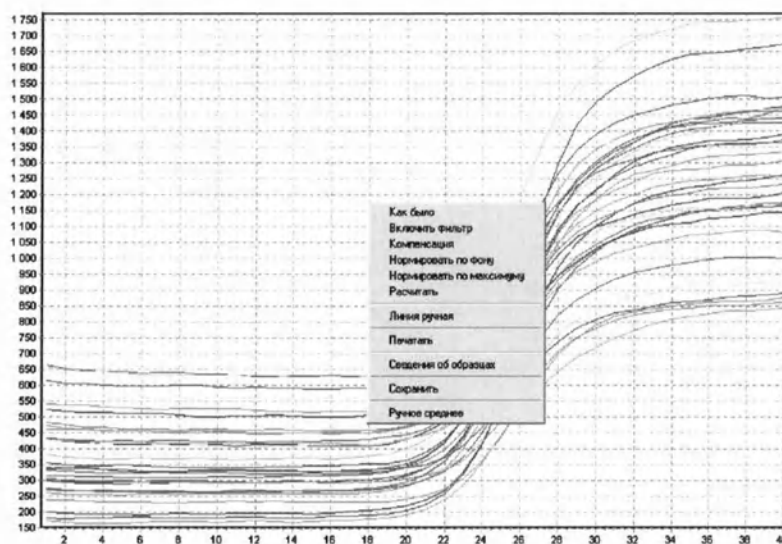


Рисунок 9.10

Правой кнопкой нажать на поле открытого окна, в результате откроется меню, показанное на рисунке 9.10. Активизировать мышью клавишу «Ручное среднее».

Для проведения процедуры коррекции нулевой линии для каждого из четырёх каналов следует выбирать файл, во время записи которого в данном канале краситель отсутствовал.

В открывшемся окне отметить точкой опцию «Значение фонового сигнала», выбрать движками значения «С какой точки начать» и «Сколько точек после начала», контролируя положение маркеров на участке графика, на котором отсутствуют сигналы (рисунок 9.11).

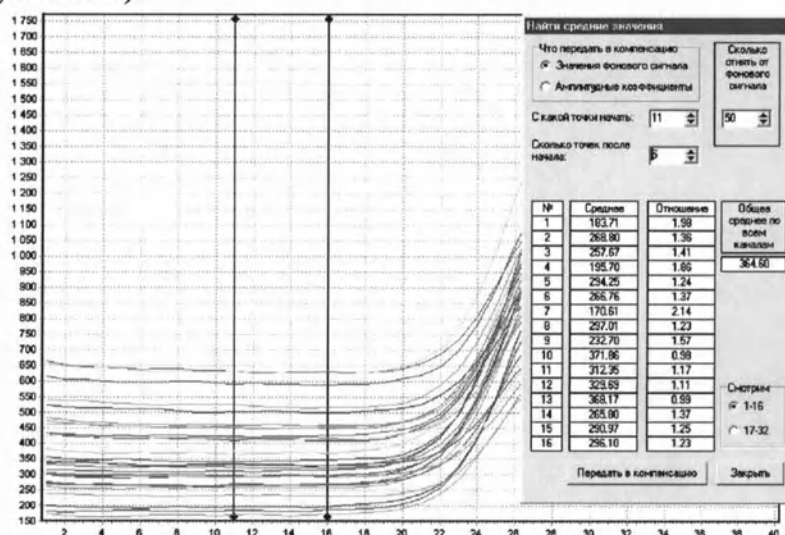


Рисунок 9.11

Активизировать мышью клавишу «Передать в компенсацию». Нажать клавишу «Выход». Правой кнопкой нажать на поле открытого окна, в результате откроется меню, показанное на рисунке 9.12.

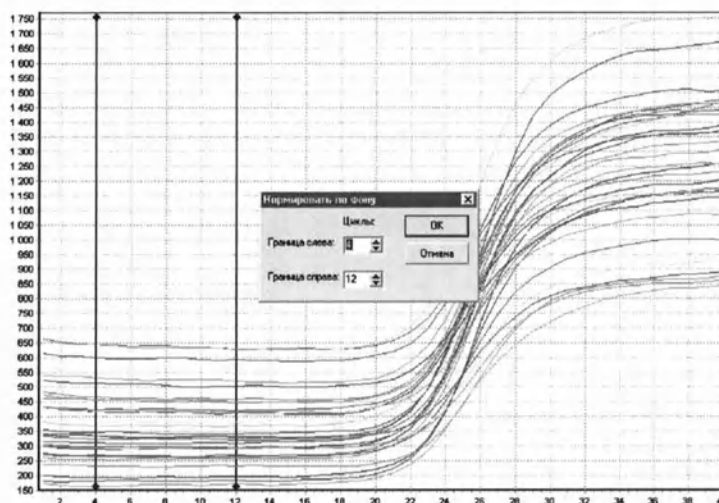


Рисунок 9.12

Нажать клавишу «Отмена». Активизировать мышью клавишу «Нормировать по фону» и клавишу «ОК». В результате откроется окно, показанное на рисунке 9.13.

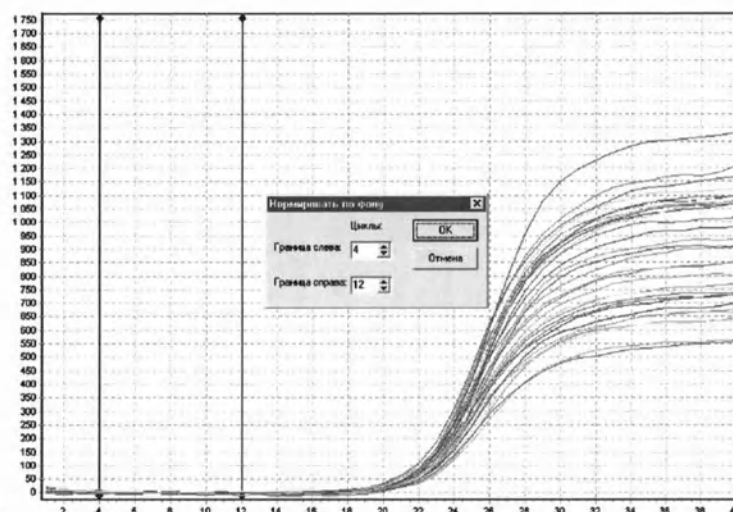


Рисунок 9.13

Коэффициент усиления

Активизировать мышью клавишу «Нормировать по фону». Как изображено на рисунке 9.10, выбрать на горизонтальном участке границы слева и справа, активизировать мышью клавиши «Применить» и «Выход».

Повторно активизировать мышью клавишу «Ручное среднее». В открывшемся окне отметить точкой опцию «Амплитудные коэффициенты», выбрать движками значения «С какой точки начать» и «Сколько точек после начала», выбрать положение маркеров на конечном участке графика, где сигналы ПЦР вышли в насыщение. Активизировать мышью клавишу «Передать в компенсацию». Нажать клавишу «Выход» (рисунок 9.14).

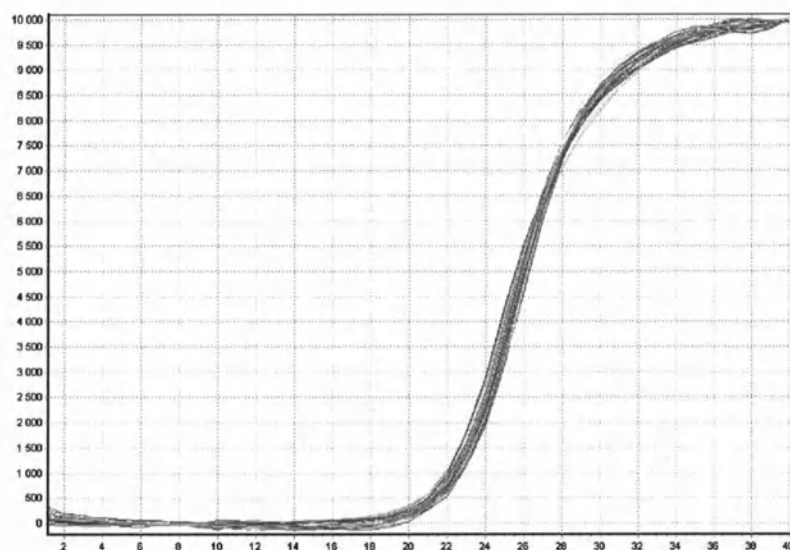


Рисунок 9.14

Включение режима компенсации

Открыть окно «Компенсация» в меню «Настройки» (рисунок 9.8).

Отметить значками опции «Включить матрицу в расчет», «Включить в просмотр» нулевую линию и коэффициент усиления.

Проверка работы матрицы пересчета

Закрыть все окна и повторно выполнить опции «Просмотр». При правильно подобранных коэффициентах взаимное влияние красителей соседних каналов будет минимально.

Проверка компенсации нулевой линии и коэффициента усиления

Закрыть все окна и повторно выполнить опции «Просмотр», «Просмотр данных» и «Как было». В результате должен получиться график, на котором нулевые линии и максимальные сигналы пробирок имеют минимальный разброс (рисунок 9.14).

Режим HOLD

Выбрав данную опцию, можно задать температуру и время для режима HOLD. Для этого движками выбрать значения этих параметров и щёлкнуть по клавише: «Сохранить» (рисунок 9.15)

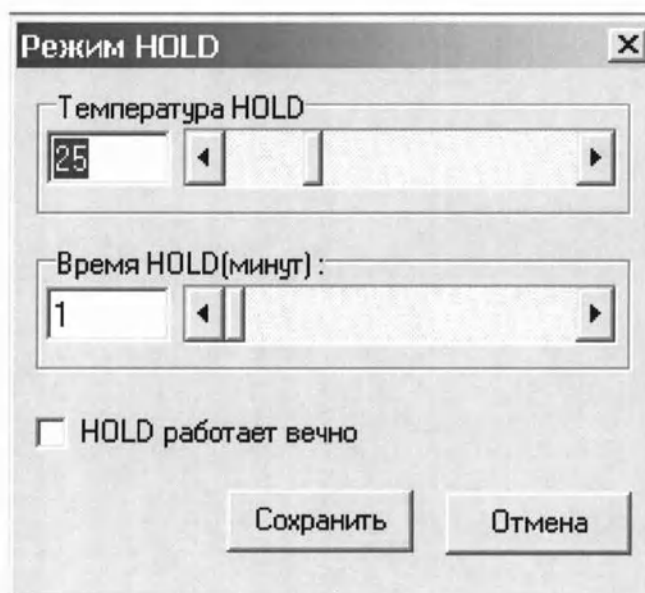


Рисунок 9.15

Тепловой режим

С помощью данной опции можно выбрать оптимальные настройки теплового блока в зависимости от объема пробы.

Для стандартного объема 25 мкл рекомендуемые параметры:

«Температура роста» - 1 °C;

«Время роста» - 8 сек.

Для объемов пробы в интервале 25-50 мкл следует установить «Время роста», равное 12 сек.

Для этого движками выбрать нужные значения и щёлкнуть по клавише «ОК» (рисунок 9.16).

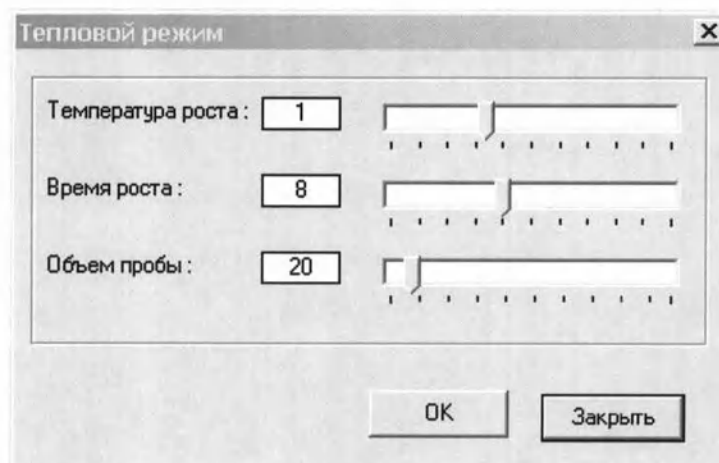


Рисунок 9.16

Спящий режим

Данный режим позволяет увеличить временной ресурс работы прибора за счёт эффективного использования элементов и узлов (таких, как галогеновая лампа), а также снизить энергопотребление и повысить безопасность эксплуатации.

Прибор переходит в данное состояние после окончания режима HOLD или сразу после окончания режима измерения (при отсутствии режима HOLD). Запуск данного режима также происходит через определённое время после включения прибора при отсутствии работы по программе.

Параметры режима устанавливаются в окне «Настройка спящего режима» (рисунок 9.17).

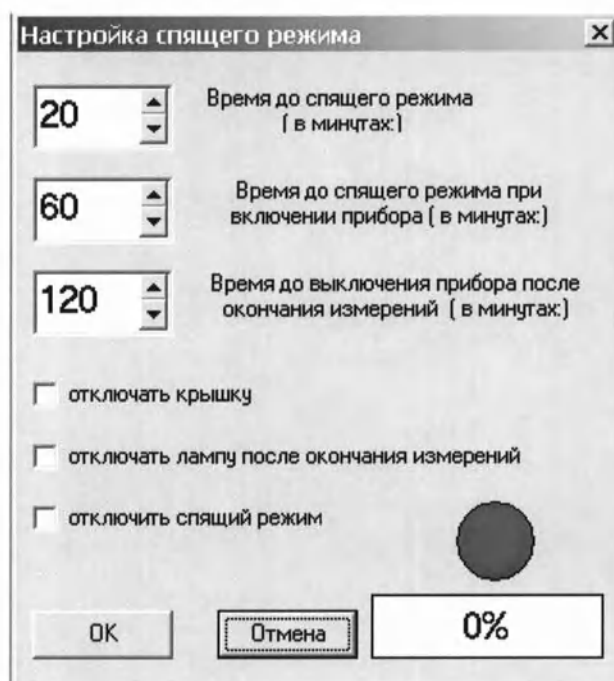


рисунок 9.17

Аппаратные настройки

ВНИМАНИЕ!

Данная опция предназначена для изготовителя прибора. Смена настроек этой опции без согласования с изготовителем может привести к выходу прибора из строя!

10 Техническое обслуживание

При проведении технического обслуживания в течение месяца используется спирт этиловый х.ч. в объеме 200 см³.

При постоянной работе устройства периодически (1 раз в месяц) производить удаление пыли и грязи ватным тампоном, смоченном в спирте, с наружных панелей корпусов и из зоны расположения пробирок.

Техническое обслуживание ПЭВМ производится в соответствии с ее руководством по эксплуатации.

11 Текущий ремонт

Текущий ремонт прибора осуществляется квалифицированными специалистами предприятия-изготовителя. Возможные неисправности и способы их устранения.

<i>Неисправность, ее внешнее проявление и дополнительные признаки</i>	<i>Вероятная причина или место неисправности</i>	<i>Способ устранения</i>
<i>Не производится загрузка программы</i>	Нарушение связи между оптическим и тепловым блоками	Проверить подсоединения соединительного кабеля между двумя модулями
<i>Упала чувствительность оптического блока, уменьшились фоновые сигналы во всех каналах, большие шумы</i>	Истекает срок работы галогенной лампы	Заменить лампу
<i>Большой нестабильный фон, низкая чувствительность</i>	Не включена тепловая крышка	Подключить тепловую крышку в соответствии с настоящей инструкцией.

Инструкция по замене лампы

Уважаемый пользователь!

Устройство комплектуется галогенной лампой, имеющей срок службы 4000 часов. Такой ресурс лампы позволяет эксплуатировать устройство длительное время (два года и более) без её замены и ухудшения эксплуатационных характеристик.

При выходе лампы из строя Вы можете обратиться к изготовителю или произвести замену лампы своими силами.

Если Вы будете внимательно следовать настоящей инструкции, то эта процедура не потребует от Вас специальных знаний и навыков и займёт совсем немного времени. Новая, предварительно настроенная лампа в патроне (рисунок 11.1), поставляется совместно с устройством.

Все инструменты, необходимые для замены, также входят в комплект поставки.

Внимание!: *Запрещается трогать руками колбу лампы. В случае касания следует протереть колбу ватой, смоченной в этиловом спирте.*



Рисунок 11.1

Для замены лампы следует произвести следующие действия:

- отсоединить разъём 1 (рисунок 11.2);
- снять кожух 2, предварительно открутив по два винта 3 с каждой стороны кожуха (рисунок 11.2);

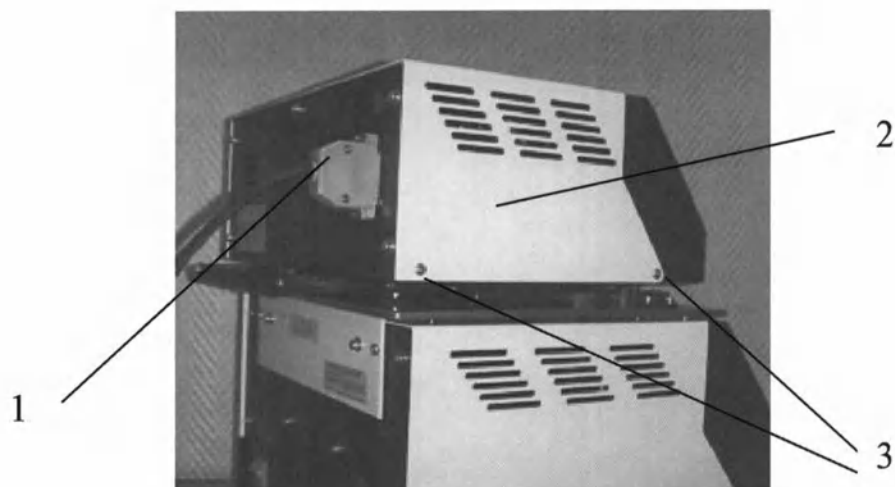


Рисунок 11.2

- снять кожух 1 с лампы, предварительно ослабив винт 2 (рисунок 11.3);
- открутить два винта 1 (рисунок 11.4);
- вынуть лампу с патроном 2, при необходимости поддев край патрона отвёрткой (рисунок 11.4);
- вынуть наконечники проводов 1 из патрона, предварительно ослабив винты 2 (рисунок 11.5);

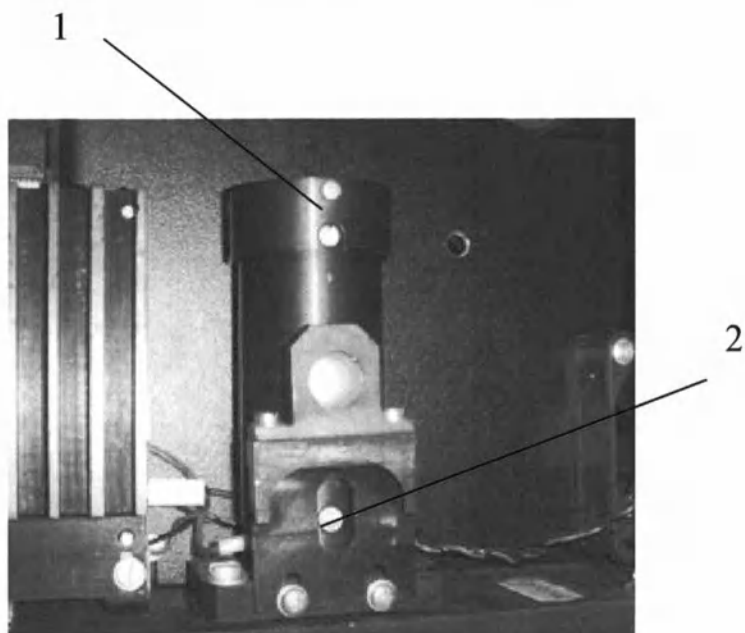


Рисунок 11.3

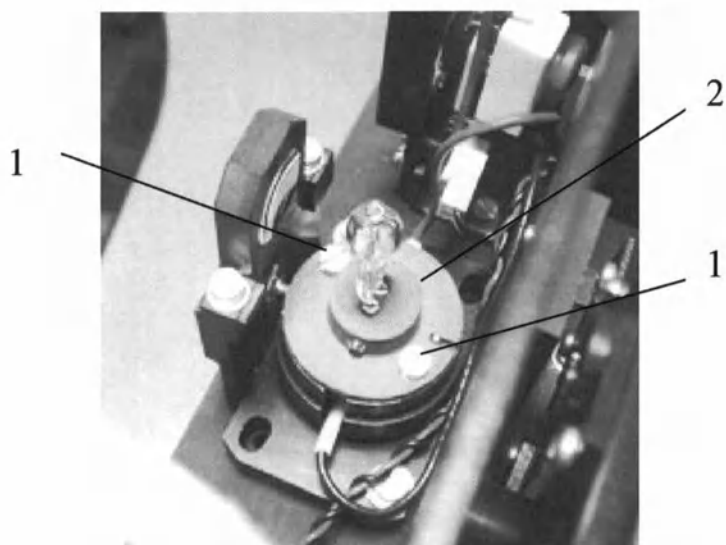


Рисунок 11.4

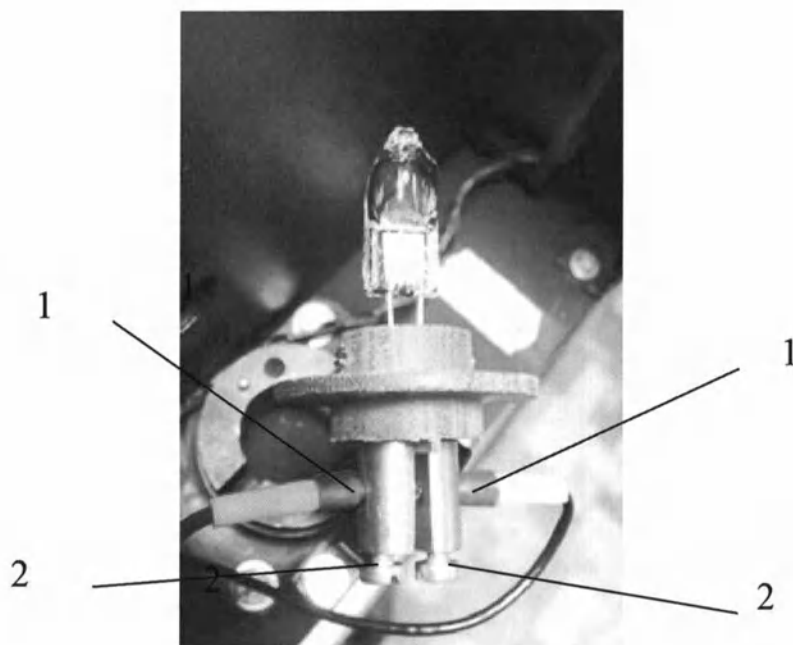


Рисунок 11.5

- взять новую лампу в патроне;
- закрепить наконечники проводов в патроне;
- установить патрон с лампой на место;
- установить и закрепить кожух лампы;
- установить общий кожух;
- присоединить разъём.

12 Хранение и транспортировка

Условия хранения устройства в упаковке предприятия – изготовителя – по ГОСТ 15150-69.

Устройство без упаковки может храниться при температуре воздуха от 5 до 40 °С и относительной влажности не более 80 % при температуре 25 °С.

В помещениях для хранения не должно быть пыли, паров кислот, щелочей, агрессивных газов и других вредных примесей, вызывающих коррозию.

Транспортирование устройства производится всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с требованиями ГОСТ Р 50444-92 и правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Вид отправки – единичное изделие.

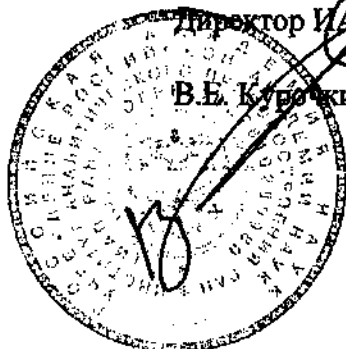
Условия транспортирования устройства – по условиям хранения 5 по ГОСТ 15150-69.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Всего прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 59 (пятьдесят девять) листов.

Директор ИАП РАН

В.Е. Курочкин



**УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РАН**

ОКП 94 4340



**Устройство компьютеризированное четырехканальное для обнаружения
в режиме реального времени флуоресцентной детекцией
специфической последовательности нуклеиновых кислот
методом полимеразной цепной реакции «АНК»**

ПАСПОРТ

ДШИ 2.848.001 ПС

**Санкт-Петербург
2010**

Содержание

1. НАЗНАЧЕНИЕ УСТРОЙСТВА.....	3
2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.	3
3. КОМПЛЕКТНОСТЬ ПОСТАВКИ.....	4
4. УСЛОВИЯ ЭКСПЛУАТАЦИИ.....	4
5. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА	5
6. СВИДЕТЕЛЬСТВО О ПРИЁМКЕ	5

Уважаемый покупатель!

Благодарим Вас за приобретение нашей продукции и рекомендуем внимательно изучить руководство по эксплуатации устройства прежде, чем Вы приступите к его эксплуатации!

ВНИМАНИЕ! Устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот АНК не является средством измерений и не нуждается в ежегодной поверке.

К паспорту прилагаются копии Регистрационного удостоверения №ФС 022а2005/2163-05 от 23 августа 2005 года и Сертификата соответствия № РОСС RU.ME01.H00423 от 03.05.2007, которые подтверждают, что Устройство АНК зарегистрировано в Российской Федерации, внесено в Государственный реестр изделий медицинского назначения и медицинской техники, удовлетворяет требованиям ГОСТов по электробезопасности и электромагнитной совместимости и является изделием лабораторной медицинской техники, которое не имеет контакта с пациентами (Код ОКП 94 4340).

НАЗНАЧЕНИЕ УСТРОЙСТВА

Устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот «АНК-32», предназначено для качественного и количественного определения фрагментов нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), а также для определения температуры плавления фрагментов ДНК.

Устройство может применяться в лабораториях медицинских диагностических центров, научно-исследовательских институтов, центрах судебно-медицинской экспертизы, а также санитарного и экологического контроля (регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития №ФС 022а2005/2163-05 от 23 августа 2005 года).

К устройству прилагается демонстрационный набор, производства ЗАО «Синтол» для периодической проверки соответствия основным техническим характеристикам.

ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Количество лунок для пробирок объёмом 0,2 мл	16, 32 или 96	
Количество каналов возбуждения и регистрации флуоресценции	4	
Длины волн возбуждения флуоресценции, нм	485, 530, 580, 630	
Длины волн регистрации флуоресценции, нм	520, 560, 620, 670	
Чувствительность (мин.-макс.), наномоль/л	Канал №1	
	Канал №2	
	Канал №3	
	Канал №4	
Разброс температур по лункам (60°C) не более (95°C) не более		
Скорость нагревания (охлаждения) пробирок, °C в секунду		
Рекомендуемая температура тепловой крышки, °C		
Габариты в мм	340x400x420	
Масса, кг	28	
Питание от сети переменного тока		
Напряжение, В	187 - 242	
Частота, Гц	50	

КОМПЛЕКТНОСТЬ ПОСТАВКИ

1.	Тепловой блок	1 шт
2.	Оптический блок	1 шт
3.	Кабель соединительный	1 шт
4.	Шнур сетевой	1 шт
5.	Кабель связи с ПЭВМ (RS 232)	1 шт
6.	Компакт-диск с программным обеспечением	1 шт
7.	Демонстрационный набор (ЗАО «Синтол»)	1 шт
8.	ПЭВМ (в обязательный комплект поставки не входит).	1 шт
9.	Транспортная упаковка	1 комплект
10.	Руководство по эксплуатации ДШИ 2.848.001. РЭ	1 шт
11.	Паспорт ДШИ 2.848.001. ПС	1 шт

УСЛОВИЯ ЭКСПЛУАТАЦИИ

1. Температура окружающего воздуха от 10 до 40 °С.
2. Относительная влажность не более 80% при 25 °С.
3. Атмосферное давление 760 ± 30 мм рт. ст. ($101,3 \pm 4$ кПа).
4. Устройство должно эксплуатироваться в лабораторных помещениях, не содержащих высоких концентраций паров агрессивных химических веществ и пыли.
5. После транспортирования и хранения в условиях отрицательных температур до начала эксплуатации устройства в транспортной упаковке должен быть выдержан при нормальных климатических условиях не менее 4 ч.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Предприятие-изготовитель **УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РАН** гарантирует соответствие устройства АНК требованиям ТУ 9443-003-04699534-2005 при соблюдении условий транспортировки, хранения, монтажа и эксплуатации.

Гарантийный срок эксплуатации – 24 месяца со дня продажи.

Гарантийный срок хранения – 6 месяцев со дня изготовления устройства.

При обнаружении неисправности устройства в период действия гарантии, а также для сервисного обслуживания в послегарантийный период обращаться на предприятие-изготовитель по адресу:

Россия, 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26, ИАП РАН

Тел. (812) 251-7110

Тел./факс: (812) 251-7038

СВИДЕТЕЛЬСТВО О ПРИЁМКЕ

Устройство компьютеризированное четырехканальное для обнаружения в режиме реального времени флуоресцентной детекцией специфической последовательности нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции «АНК»

заводской номер № _____

соответствует требованиям ТУ 9443-003-04699534-2005

и признано годным к эксплуатации.

Начальник ОТК

Подпись

Расшифровка

Дата выпуска

Директор предприятия-изготовителя

Подпись

Расшифровка

Дата выпуска

М.П.

Мы будем благодарны за все Ваши конструктивные предложения и замечания по работе устройства!

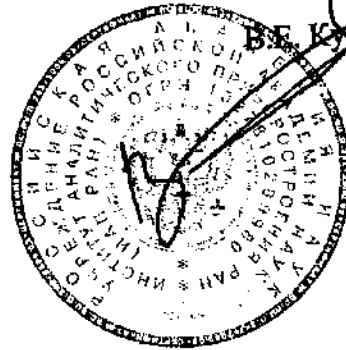
КАРТА ОБСЛУЖИВАНИЯ И РЕМОНТА

устройства АНК

Заводской номер _____

Дата	Вид работ	Фактически выполненные действия	Гарантия ФИО Подпись
1	2	3	4

Всего прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 6 (шесть) листов.
Директор ЦАП РАН



В.Е. Курочкин