

**Набор адаптеров
для подготовки NGS библиотек**

"ADP Display"

Инструкция по применению

RUO

Только для исследовательских целей

Содержание

Содержание	2
Введение	3
Варианты исполнения	3
1 Назначение набора	3
2 Характеристика набора	3
2.1 Состав набора адаптеров	3
2.2 Количество реакций	4
2.3 Принцип действия набора	4
3 Меры предосторожности	7
4 Оборудование и материалы	8
4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	8
4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	8
5 Материал для лигирования адаптеров	9
6 Подготовка адаптеров к работе	9
6.1 Выбор адаптеров	9
6.2 Расчет количества адаптеров	9
6.3 Подготовка адаптеров	10
7 Требования к транспортированию и хранению	11
7.1 Транспортирование	11
7.2 Хранение	11
8 Указания по применению	11
9 Требования к утилизации	12
10 Гарантийные обязательства	12
11 Маркировка	13

Введение

В медицинской генетике и научно-исследовательской практике широко применяется технология массового параллельного секвенирования (NGS). Исследование образцов двуцепочечной ДНК (дцДНК) методами NGS требует подготовки библиотек – совокупности фрагментов образца ДНК, модифицированных соответствующим образом. В дальнейшем библиотеки загружаются в секвенатор, что позволяет получить массив данных с информацией о последовательности различных фрагментов библиотеки.

Варианты исполнения

Набор адаптеров для подготовки NGS-библиотек "ADP Display" (далее по тексту – набор адаптеров) представлен в трех вариантах исполнения:

- 1) Набор из 8 адаптеров "ADP Display (8)";
- 2) Набор из 24 адаптеров "ADP Display (24)";
- 3) Набор из 96 адаптеров "ADP Display (96)".

1 Назначение набора

Набор адаптеров предназначен для приготовления библиотек ДНК для дальнейшего секвенирования методом NGS на платформах Illumina. Использование адаптеров обеспечивает связывание исследуемых фрагментов дцДНК с поверхностью проточной кюветы секвенатора и их идентификацию. Лигирование адаптеров, содержащих уникальные последовательности (индексы) к фрагментам исследуемой дцДНК позволяет однозначно маркировать исследуемые образцы и проводить секвенирование нескольких образцов в одной проточной кювете.

Набор адаптеров предназначен только для исследовательских целей (RUO).

2 Характеристика набора

2.1 Состав набора адаптеров

В состав набора входят адаптеры с индексами (Y_i), вода для ПЦР.

Набор "ADP Display (8)":

- Y_i (i изменяется от 1 до 8),
- Вода для ПЦР.

Набор "ADP Display (24)":

- Y_i (i изменяется от 1 до 24),
- Вода для ПЦР.

Набор "ADP Display (96)":

- Y_i (i изменяется от 1 до 96),
- Вода для ПЦР.

Каждый адаптер разведен в воде для ПЦР в концентрации 14 мкМ.

Состав набора и объем реагентов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора и объем реагентов

Набор	Наименование реагента	Значение i	Пробирка, шт	Номинальный объем, мкл
Набор из 8 адаптеров	Y_i	от 1 до 8	8	44
	Вода для ПЦР	–	1	1000
Набор из 24 адаптеров	Y_i	от 1 до 24	24	44
	Вода для ПЦР	–	1	1900
Набор из 96 адаптеров	Y_i	от 1 до 96	96	44
	Вода для ПЦР	–	3	1900

2.2 Количество реакций

Набор из 8 адаптеров "ADP Display (8)" позволяет приготовить 4 библиотеки на 8 образцов, всего 32 библиотеки.

Набор из 24 адаптеров "ADP Display (24)" позволяет приготовить 4 библиотеки на 24 образца, всего 96 библиотек.

Набор из 96 адаптеров "ADP Display (96)" позволяет приготовить 4 библиотеки на 96 образцов, всего 384 библиотеки.

2.3 Принцип действия набора

Y -адаптер состоит из двух нуклеотидных последовательностей, комплементарных на участке из 12 нуклеотидов. Каждая нуклеотидная последовательность содержит сайт связывания с поверхностью проточной кюветы секвенатора (P5 или P7), уникальный индекс ($i5$ или $i7$) и участок посадки праймера для секвенирования. Последовательности адаптеров приведены в таблице 2.

Таблица 2. Последовательности адаптеров

Название структуры	Последовательность, 5' – 3'
P7 часть адаптера	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC [Index i7] ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
P5 часть адаптера	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [Index i5] ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

P5 часть адаптера содержит 3'-dT, что позволяет проводить лигирование адаптеров с 3'-dA-фрагментами исследуемой дцДНК. Подобный тип лигирования адаптеров называется T–A лигированием.

Схема лигирования адаптеров к исследуемым фрагментам дцДНК представлена на рисунке 1.

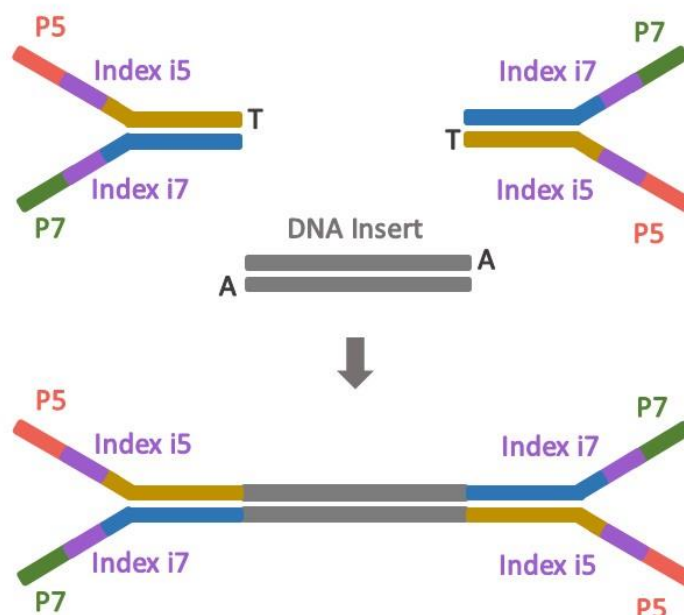


Рис. 1. Принцип лигирования адаптеров к исследуемым фрагментам дцДНК.

P5 и P7 – сайты связывания с поверхностью проточной кюветы.

Каждый Y-адаптер содержит два уникальных индекса, что позволяет однозначно маркировать образцы и проводить секвенирование нескольких образцов в одной проточной кювете. Последовательности индексов приведены в таблице 3.

Таблица 3. Последовательности индексов

Название адаптера	Индекс i7, 5' – 3'	Индекс i5, 5' – 3'	Название адаптера	Индекс i7, 5' – 3'	Индекс i5, 5' – 3'
Y ₁	CCGCGGTT	AGCGCTAG	Y ₄₉	ATATCTCG	ATCTTAGT
Y ₂	TTATAACC	GATATCGA	Y ₅₀	GCGCTCTA	GCTCCGAC
Y ₃	GGACTTGG	CGCAGACG	Y ₅₁	AACAGGTT	ATACCAAG
Y ₄	AAGTCCAA	TATGAGTA	Y ₅₂	GGTGAACC	GCGTTGGA
Y ₅	ATCCTACTG	AGGTGCGT	Y ₅₃	CAACAATG	CTTCACGG
Y ₆	GCTTGTCA	GAACATAC	Y ₅₄	TGGTGGCA	TCCTGTAA
Y ₇	CAAGCTAG	ACATAGCG	Y ₅₅	GTTCGCCG	GCTCATTG
Y ₈	TGGATCGA	GTGCGATA	Y ₅₆	CACGAGCG	ATCTGCCA

Y ₉	AGTTCAGG	CCAACAGA	Y ₅₇	TGCGGCGT	CCTCGGTA
Y ₁₀	GACCTGAA	TTGGTGAG	Y ₅₈	CATAATAC	TTCTAACG
Y ₁₁	TCTCTACT	CGCGGTTC	Y ₅₉	GATCTATC	ATGAGGCT
Y ₁₂	CTCTCGTC	TATAACCT	Y ₆₀	AGCTCGCT	GCAGAATC
Y ₁₃	CCAAGTCT	AAGGATGA	Y ₆₁	CGGAACTG	CACTACGA
Y ₁₄	TTGGAICT	GGAAGCAG	Y ₆₂	TAAGGTCA	TGTCGTAG
Y ₁₅	CAGTAGGC	TGACGAAT	Y ₆₃	TTGCCTAG	ACCACTTA
Y ₁₆	TGACGAAT	CAGTAGGC	Y ₆₄	CCATTCGA	GTTGTCCG
Y ₁₇	TAATACAG	ATATTCAC	Y ₆₅	ACACTAAG	ATCCATAT
Y ₁₈	CGGCGTGA	GCGCCTGT	Y ₆₆	GTGTCGGA	GCTTGCGC
Y ₁₉	ATGTAAGT	ACTCTATG	Y ₆₇	TTCCTGTT	AGTATCTT
Y ₂₀	GCACGGAC	GTCTCGCA	Y ₆₈	CCTTCACC	GACGCTCC
Y ₂₁	GGTACCTT	AAGACGTC	Y ₆₉	GCCACAGG	CATGCCAT
Y ₂₂	AACGTTCC	GGAGTACT	Y ₇₀	ATTGTGAA	TGCATTGC
Y ₂₃	GCAGAATT	ACCGGCCA	Y ₇₁	ACTCGTGT	ATTGGAAC
Y ₂₄	ATGAGGCC	GTTAATTG	Y ₇₂	GTCTACAC	GCCAAGGT
Y ₂₅	ACTAAGAT	AACCGCGG	Y ₇₃	CAATTAAC	CGAGATAT
Y ₂₆	GTCGGAGC	GGTTATAA	Y ₇₄	TGGCCGGT	TAGAGCGC
Y ₂₇	CTTGGTAT	CCAAGTCC	Y ₇₅	AGTACTCC	AACCTGTT
Y ₂₈	TCCAACGC	TTGGAICTT	Y ₇₆	GACGTCTT	GGTTCACC
Y ₂₉	CCGTGAAG	CAGTGGAT	Y ₇₇	TGCGAGAC	CATTGTTG
Y ₃₀	TTACAGGA	TGACAAGC	Y ₇₈	CATAGAGT	TGCCACCA
Y ₃₁	GGCATTCT	CTAGCTTG	Y ₇₉	ACAGGCGC	CTCTGCCT
Y ₃₂	AATGCCTC	TCGATCCA	Y ₈₀	GTGAATAT	TCTCATTC
Y ₃₃	TACCGAGG	CCTGAACT	Y ₈₁	AACTGTAG	ACGCCGCA
Y ₃₄	CGTTAGAA	TTCAGGTC	Y ₈₂	GGTCACGA	GTATTATG
Y ₃₅	AGCCTCAT	AGTAGAGA	Y ₈₃	CTGCTTCC	GATAGATC
Y ₃₆	GATTCTGC	GACGAGAG	Y ₈₄	TCATCCTT	AGCGAGCT
Y ₃₇	TCGTAGTG	AGACTTGG	Y ₈₅	AGGTTATA	CAGTTCCG
Y ₃₈	CTACGACA	GAGTCCAA	Y ₈₆	GAACCGCG	TGACCTTA
Y ₃₉	TAAGTGGT	CTTAAGCC	Y ₈₇	CTCACCAA	CTAGGCAA
Y ₄₀	CGGACAAC	TCCGGATT	Y ₈₈	TCTGTTGG	TCGAATGG
Y ₄₁	ATATGGAT	CTGTATTA	Y ₈₉	TATCGCAC	CTTAGTGT
Y ₄₂	GCGCAAGC	TCACGCCG	Y ₉₀	CGCTATGT	TCCGACAC
Y ₄₃	AAGATACT	ACTTACAT	Y ₉₁	GTATGTTC	AACAGGAA
Y ₄₄	GGAGCGTC	GTCCGTGC	Y ₉₂	ACGCACCT	GGTGAAGG
Y ₄₅	ATGGCATG	AAGGTACC	Y ₉₃	TACTCATA	CCTGTGGC
Y ₄₆	GCAATGCA	GGAACGTT	Y ₉₄	CGTCTGCG	TTCACAAT
Y ₄₇	GTTCCAAT	AATTCTGC	Y ₉₅	TCGATATC	ACACGAGT
Y ₄₈	ACCTTGGC	GGCCTCAT	Y ₉₆	CTAGCGCT	GTGTAGAC

3 Меры предосторожности

- 3.1 Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в ПЦР-лаборатории.
- 3.2 Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
- 3.3 Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
- 3.4 Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
- 3.5 При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки без талька. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- 3.6 Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
- 3.7 При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
- 3.8 Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- 3.9 После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Провести обработку рабочих поверхностей оборудования дезинфицирующими средствами.
- 3.10 Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
- 3.11 Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.

П р и м е ч а н и е – Набор реагентов не содержит веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

3.12 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.

4 Оборудование и материалы

4.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

- Автоматические дозаторы одноканальные переменного объема, разных объемов (например, DiscoveryComfort, Corning HTL SA, Польша или аналогичные).
- Мини-центрифуга-вортекс (например, «Микроспин» FV-2400 SIA «Biosan», Латвия или аналогичный).
- ПЦР-бокс 2-го класса биологической защиты для работы с ДНК (например, БАВ-ПЦР-Ламинар-С, ЗАО «Ламинарные системы», Россия или аналогичный).
- Термостол холодный (например, Микротермостат М-210, ООО «БИС-Н», Россия или аналогичный).
- Холодильник с морозильной камерой от минус 18 до минус 25°C (например, ATLANT XM-6023-031, ЗАО «АТЛАНТ», РБ или аналогичный).

4.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

- Контейнер одноразовый, пластиковый для сброса отходов (например, «ЕК-01», ООО «КМ-ПРОЕКТ», Россия или аналогичный).
- Пробирки микроцентрифужные градуированные, объемом 0,2; 0,5; 1,5 мл (Axugen Inc., США или Bio-Rad Laboratories Inc., США).
- Наконечники для дозаторов универсальные с фильтром, разных объемов (например, Axugen Inc., США или аналогичные).
- Перчатки медицинские одноразовые неопудренные нитриловые или латексные (например, TG MEDICAL Sdn. Bhd., Малайзия или аналогичные).

- Штативы для пробирок разных объёмов (например, Axugen Inc., США или аналогичные).

5 Материал для лигирования адаптеров

Адаптеры лигируют к фрагментам дцДНК (в том числе геномной ДНК человека), продуктам таргетной амплификации ДНК, разведенным в воде или буфере (10 mM Трис-НСl, pH 8.0 – 8.5). Фрагменты дцДНК должны быть подготовлены специальным образом и иметь однонитевой выступ 3'-dA.

Количество ДНК, которое может быть использовано в данном наборе, составляет от 10 до 100 нг.

Для приготовления библиотек рекомендуется использовать набор L1B Display (ООО «ДНК-Дисплей», Россия). Также возможно использование наборов в основе которых лежит принцип Т–А лигирования от других производителей.

6 Подготовка адаптеров к работе

6.1 Выбор адаптеров

Если планируется загрузка нескольких библиотек для секвенирования в одну проточную кювету, необходимо выбрать адаптеры из представленных в таблице 4, следуя следующим рекомендациям: следует смешивать адаптеры, расположенные в одной колонке таблицы; не рекомендуется смешивать адаптеры, расположенные в одном ряду таблицы.

Выбрать адаптеры для всех исследуемых образцов, используя таблицу 4.

Таблица 4. Адаптеры

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Y ₁	Y ₉	Y ₁₇	Y ₂₅	Y ₃₃	Y ₄₁	Y ₄₉	Y ₅₇	Y ₆₅	Y ₇₃	Y ₈₁	Y ₈₉
B	Y ₂	Y ₁₀	Y ₁₈	Y ₂₆	Y ₃₄	Y ₄₂	Y ₅₀	Y ₅₈	Y ₆₆	Y ₇₄	Y ₈₂	Y ₉₀
C	Y ₃	Y ₁₁	Y ₁₉	Y ₂₇	Y ₃₅	Y ₄₃	Y ₅₁	Y ₅₉	Y ₆₇	Y ₇₅	Y ₈₃	Y ₉₁
D	Y ₄	Y ₁₂	Y ₂₀	Y ₂₈	Y ₃₆	Y ₄₄	Y ₅₂	Y ₆₀	Y ₆₈	Y ₇₆	Y ₈₄	Y ₉₂
E	Y ₅	Y ₁₃	Y ₂₁	Y ₂₉	Y ₃₇	Y ₄₅	Y ₅₃	Y ₆₁	Y ₆₉	Y ₇₇	Y ₈₅	Y ₉₃
F	Y ₆	Y ₁₄	Y ₂₂	Y ₃₀	Y ₃₈	Y ₄₆	Y ₅₄	Y ₆₂	Y ₇₀	Y ₇₈	Y ₈₆	Y ₉₄
G	Y ₇	Y ₁₅	Y ₂₃	Y ₃₁	Y ₃₉	Y ₄₇	Y ₅₅	Y ₆₃	Y ₇₁	Y ₇₉	Y ₈₇	Y ₉₅
H	Y ₈	Y ₁₆	Y ₂₄	Y ₃₂	Y ₄₀	Y ₄₈	Y ₅₆	Y ₆₄	Y ₇₂	Y ₈₀	Y ₈₈	Y ₉₆

6.2 Расчет количества адаптеров

Расчет количества адаптеров приведен для варианта приготовления библиотеки с использованием 100 нг дцДНК исследуемого образца и набора

реагентов L1B Display (ООО «ДНК-Дисплей», Россия). Общий объем всех реагентов в одной реакции лигирования постоянен и составляет 60 мкл, объем образца, вносимого в реакцию, составляет 20 мкл. Диапазон длин фрагментов дцДНК выбран 150–250 п.н., среднее значение длины фрагментов принимается как среднее арифметическое крайних значений диапазона и составляет 200 п.н.

При использовании данного набора адаптеров оптимальное соотношение количества адаптеров к количеству фрагментов составляет 200:1. Расчетное количество адаптеров на одну реакцию лигирования представлено в таблице 5.

Таблица 5. Объем реагентов на одну реакцию

Адаптер	Значение i	Концентрация дцДНК, нг/мкл	Объем образца, мкл	Концентрация адаптера, мкМ	Объем адаптера, мкл
Yi	от 1 до 96	5	20	14	11

Важно соблюдать оптимальное соотношение количества фрагментов исследуемой дцДНК и адаптеров. В случае использования фрагментов дцДНК большей длины, пропорционально уменьшается их количество в образце и соответственно, необходимо уменьшать количество адаптеров, участвующих в реакции лигирования. Для сохранения общего объема реагентов в реакции лигирования необходимо развести исходный раствор адаптеров водой для ПЦР. Соотношение значения концентрации адаптеров и средней длины фрагментов дцДНК представлено в таблице 6.

Таблица 6. Концентрация адаптеров

Объем образца, мкл	Концентрация дцДНК, нг/мкл	Диапазон длин фрагментов дцДНК, п.н.	Средняя длина фрагментов дцДНК, п.н.	Объем адаптера, мкл	Концентрация адаптера, мкМ
20	5	150–250	200	11	14
20	5	200–350	275	11	10,2
20	5	275–475	375	11	7,5
20	5	350–600	475	11	5,9

Если в реакции лигирования используется меньшее количество дцДНК, необходимо развести исходный раствор адаптеров водой для ПЦР для сохранения соотношения количества адаптеров и фрагментов дцДНК.

Рассчитать необходимое количество каждого выбранного адаптера в соответствии с количеством дцДНК в образце, средней длиной фрагментов дцДНК.

6.3 Подготовка адаптеров

Разморозить выбранные адаптеры при комнатной температуре. Перемешать на вортексе и кратко центрифугировать в течение 1–2 сек при 1000 об/мин.

Приготовить рассчитанные количества адаптеров в соответствии с количеством образцов дцДНК и количеством дцДНК в образцах. Разместить пробирки с адаптерами на термостолу, предварительно охлажденном до 4°C (для охлаждения реагентов можно использовать лед).

ВАЖНО! Оставшиеся адаптеры сразу убрать на хранение при минус 18°C. Не хранить разведенные растворы адаптеров. Рекомендуется использовать в реакции свежеприготовленные растворы адаптеров.

Дальнейшее лигирование адаптеров проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов LIB Display (ООО «ДНК-Дисплей», Россия) или другого производителя.

7 Требования к транспортированию и хранению

7.1 Транспортирование

Транспортирование набора адаптеров осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре не выше минус 18°C.

Наборы адаптеров, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

7.2 Хранение

Набор адаптеров следует хранить в холодильнике или морозильной камере при температуре от минус 18 до минус 22°C в течение всего срока годности набора.

Наборы адаптеров, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

8 Указания по применению

8.1 Набор адаптеров должен применяться согласно инструкции по применению.

8.2 В процессе постановки эксперимента адаптеры рекомендуется хранить на термостолу с температурой 4°C или в штативе с охлаждением (на льду).

8.3 Следует избегать излишних (более пяти) циклов замораживания-размораживания адаптеров. Если набор адаптеров предполагается использовать на длительном промежутке времени с постановкой небольшого количества реакций, рекомендуется предварительно разделить раствор адаптеров на аликвоты.

8.4 Не хранить разведенные растворы адаптеров. Рекомендуется использовать в эксперименте свежеприготовленные растворы адаптеров.

8.5 Наборы адаптеров с истекшим сроком годности применению не подлежат.

9 Требования к утилизации

9.1 При использовании набора адаптеров образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

9.2 Наборы адаптеров, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и неиспользованные адаптеры относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

9.3 Упаковка набора адаптеров (коробки картонные) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

10 Гарантийные обязательства

10.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора адаптеров требованиям нормативной и технической документации в течении указанного срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

10.2 Срок годности набора адаптеров – 12 месяцев со дня выпуска при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

10.3 Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по телефону: +7 (383)382-99-80.

10.4 Рекламации по вопросам качества набора адаптеров "ADP Display" следует направлять в ООО «ДНК-дисплей» по адресу: 630090 г. Новосибирск, ул. Николаева, 13. Тел: +7 (383)382-99-20, e-mail: dna-display@mail.ru

11 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы:

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Обратитесь к инструкции по применению		Дата изготовления (месяц, год)
	Изготовитель		Использовать до (месяц, год)

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, 13

Телефон: (383)382-99-80

E-mail: dna-display@mail.ru

Веб-сайт: dna-display.ru

Версия от 20 июля 2021 г.