

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

для выявления аллели 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA В*5701) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

«АмплиСенс[®] Геноскрин HLA В*5701-FL»

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия).....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия).....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ «Mx3000P», «Mx3005» («Stratagene», США)	17

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления аллели 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA В*5701) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **«АмплиСенс® Геноскрин HLA В*5701-FL»** совместно с приборами для ПЦР в «реальном времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- iCycler iQ, iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология»),
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
канал для флуорофора FAM	FAM/Green
канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3

¹ Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора «Rotor-Gene» 3000 и «Rotor-Gene» 6000 рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или пробирок на 0,1 мл.

Поместить микропробирки в ячейки ротора прибора «Rotor-Gene» 3000/6000 так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1; установить ротор в прибор, закрыть крышку (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000/для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

Программирование амплификатора:

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**), и отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками («Rotor-Gene» 3000)/одето фиксирующее кольцо («Rotor-Gene» 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры.

Программа амплификации для приборов роторного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling1/ Циклирование1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
Cycling2/ Циклирование2	95	5 с	–	40
	60	40 с	FAM/Green, JOE/Yellow	

6. Нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**
 - осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - установка калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
10. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип **None/Пусто**.

ВНИМАНИЕ! При установке типа **None/Пусто** данные образца анализироваться не будут!

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют результаты амплификации участка ДНК HLA В*5701 и ВКО. Накопление продукта амплификации участка ДНК HLA В*5701 детектируется по каналу JOE/Yellow, а накопление продукта амплификации ВКО – по каналу для детекции флуорофора FAM/Green.

Анализ результатов амплификации ВКО (эндогенный внутренний контроль):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.

2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **10%**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК HLA B*5701.

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **20%**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

1. Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в случае получения удовлетворительных результатов для положительных и отрицательных контролей амплификации и выделения ДНК (см. табл. 1).

Таблица 1

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа (Rotor-Gene)

Контроли	Контролируемый этап	Значение Ct по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
OK	Выделение ДНК	> вкладыш или отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	< вкладыш (положительный)	< вкладыш (положительный)

Учет результатов в исследуемых клинических образцах

1. **Образец считается положительным**, если на канале JOE/Yellow получен положительный результат и значение Ct не более чем на 5 циклов превышает значение Ct на канале FAM/Green.
2. **Образец считается отрицательным**, если на канале JOE/Yellow получен отрицательный результат или значение Ct превышает значение Ct на канале FAM/Green более чем на 5.

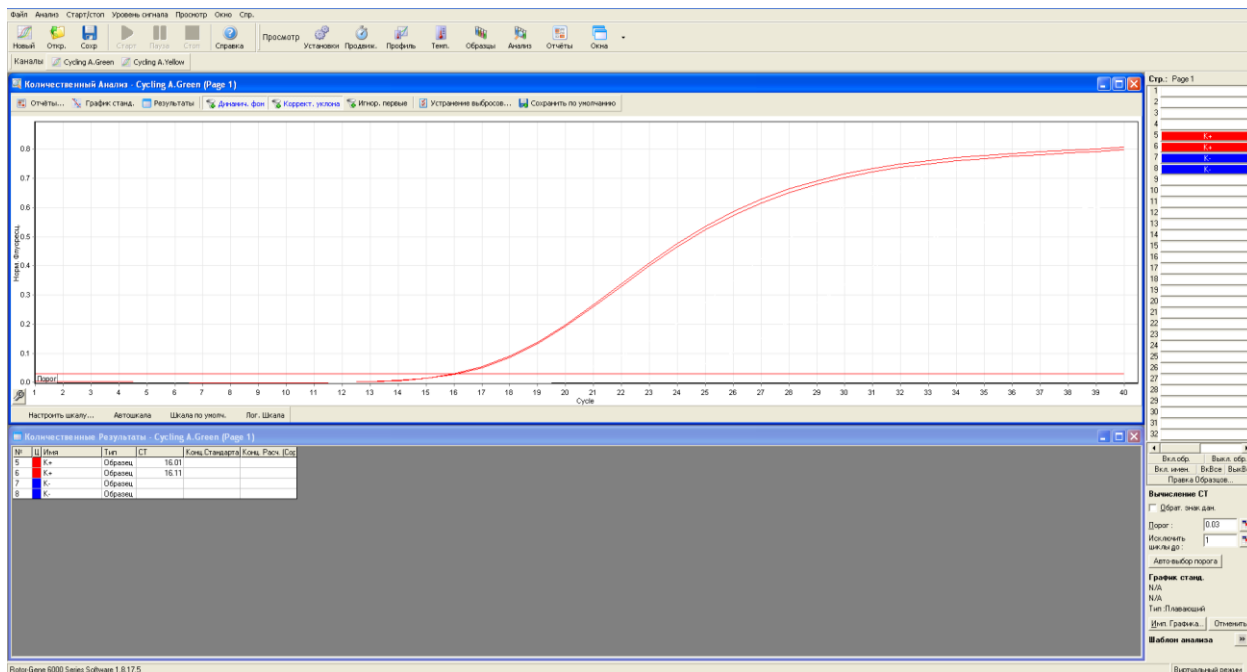
Возможные ошибки.

1. В пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по любому из каналов. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо повторное проведение анализа, начиная с этапа ПЦР.
2. В исследуемом образце не определено значение порогового цикла Ct по каналу ВКО. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
3. В исследуемом образце значение порогового цикла Ct по каналу ВКО более значения, указанного во вкладыше. В этом случае образец считается **сомнительным**. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
4. В отрицательном контроле ПЦР детектируется положительный сигнал по любому из каналов, что свидетельствует о контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.
5. В отрицательном контроле выделения детектируется положительный сигнал по каналу JOE/Yellow (HLA B*5701), либо по каналу FAM/Green (ВКО) значение

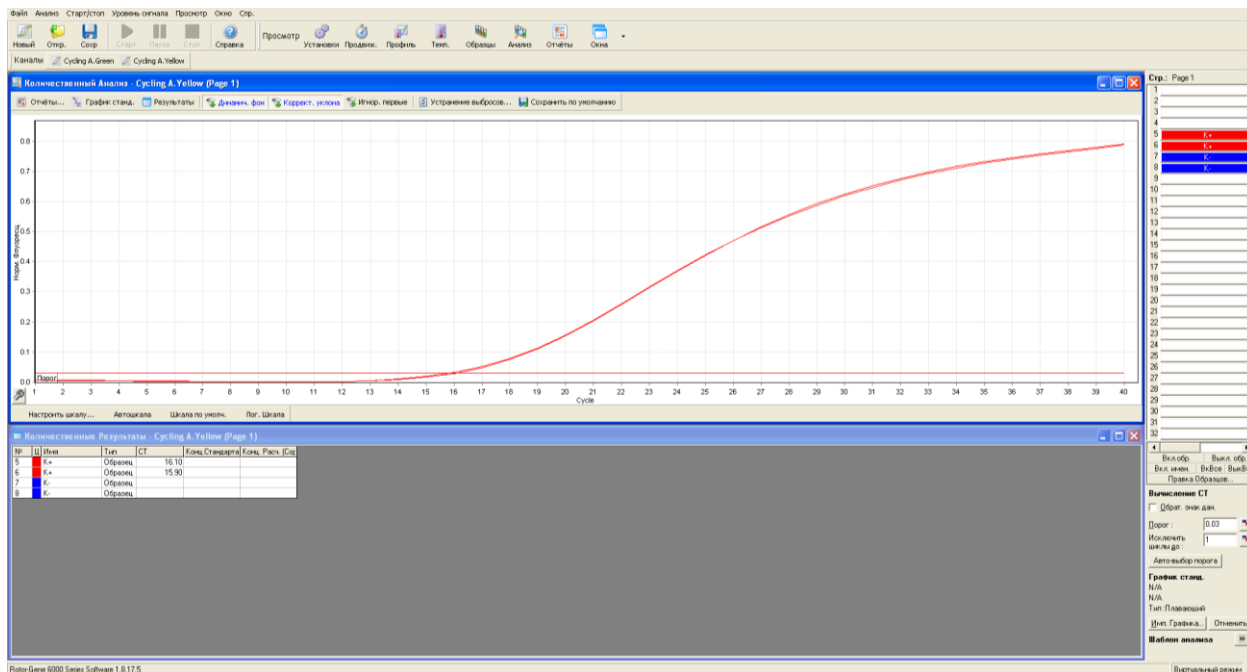
порогового цикла C_t менее значения, указанного во вкладке. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по каналу FAM/Green – ВКО:



Данные по каналу JOE/Yellow – образцы, содержащие ДНК HLA B*5701:



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

1. Включить прибор, запустить программу iQ5.

ВНИМАНИЕ! Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее **15 мин.**

2. Поместить микропробирки или стрипы (часть плашки) или плашку в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках микропробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте стрипы/плашку при установке в прибор.

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать параметры амплификации.

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	50 с	FAM, JOE/HEX	

3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.
5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, для всех образцов задать измерение флуоресценции по двум каналам: FAM, JOE/HEX.
6. Задать объем реакции **Sample Volume - 25 мкл**, тип крышек (**Domed Caps**), тип пробирок (**Vessel Type**). Амплификацию необходимо проводить с использованием такого же типа пластика, в котором проводилась калибровка прибора. Сохранить схему планшета.
7. Нажать кнопку **Run**. В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют результаты амплификации участка ДНК HLA В*5701 и ВКО. Накопление продукта амплификации участка ДНК HLA В*5701 детектируется по каналу JOE/HEX, а накопление продукта амплификации ВКО – по каналу для детекции флуорофора FAM. Рекомендуется результаты, полученные на приборе «iCycler iQ», анализировать при помощи программного обеспечения прибора «iQ5».

Обработка данных

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого в модуле **Workshop** нажать **Data file** и выбрать файл данных. Перейти в режим **Data Analysis**.
2. Просмотреть данные отдельно по каждому каналу.
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговых линий (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов.
4. Для анализа результатов активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).

Учет результатов в контрольных образцах

1. Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в случае получения удовлетворительных результатов для положительных и отрицательных контролей амплификации и выделения ДНК (см. табл. 2).

Таблица 2

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа («Bio-Rad»)

Контроли	Контролируемый этап	Результат по значению Ct	
		Канал FAM	Канал JOE/HEX
ОК	Выделение ДНК	> вкладыш или отсутствует	отсутствует
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	< вкладыш (положительный)	< вкладыш (положительный)

Учет результатов в исследуемых клинических образцах

1. **Образец считается положительным**, если на канале JOE/HEX получен положительный результат и значение Ct не более чем на 5 циклов превышает значение Ct на канале FAM.

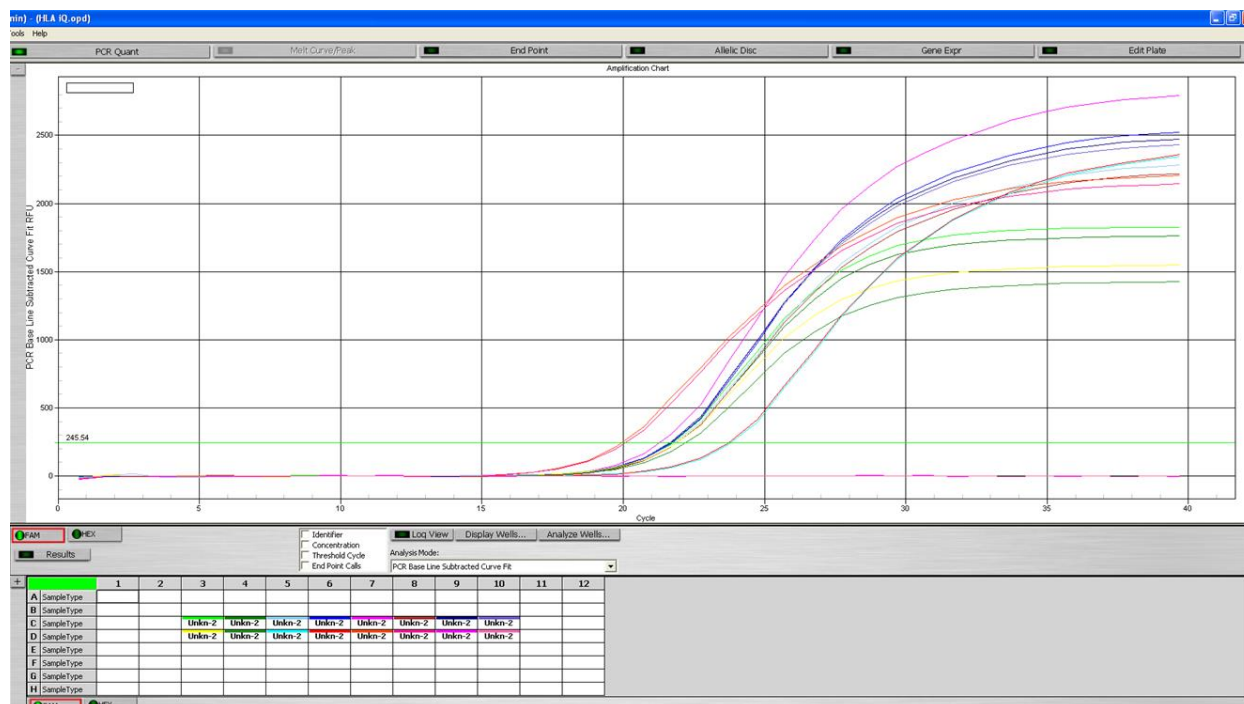
2. **Образец считается отрицательным**, если на канале JOE/HEX получен отрицательный результат или значение C_t превышает значение C_t на канале FAM более чем на 5.

Возможные ошибки.

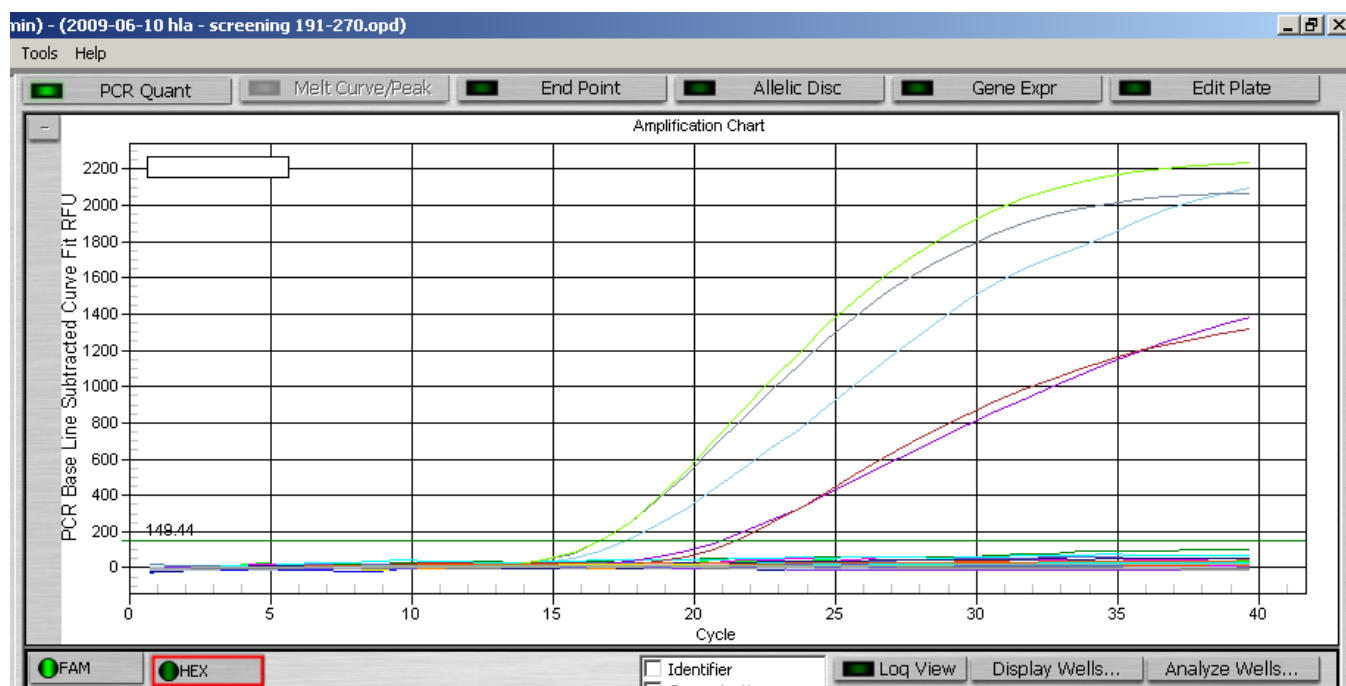
1. В пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по любому из каналов. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо повторное проведение анализа, начиная с этапа ПЦР.
2. В исследуемом образце не определено значение порогового цикла C_t по каналу ВКО. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
3. В исследуемом образце значение порогового цикла C_t по каналу ВКО более значения, указанного во вкладыше. В этом случае образец считается **сомнительным**. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
4. В отрицательном контроле ПЦР детектируется положительный сигнал по любому из каналов, что свидетельствует о контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.
5. В отрицательном контроле выделения детектируется положительный сигнал по каналу JOE/HEX (HLA B*5701), либо по каналу FAM (ВКО) значение порогового цикла C_t менее значения, указанного во вкладыше. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по каналу FAM – ВКО:



Данные по каналу JOE/HEX – образцы, содержащие ДНК HLA B*5701:



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов.

1. Включить прибор и запустить программу «RealTime_PCR v.7.3». В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – «**B5701-FL**» и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный
 - **Метод** – Пороговый (Ct)
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль –
 - **Контроли**: положительный (K+) – 1 , отрицательный (K-) – 1.
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл
 - **Флуорофоры** – Fam – ВК; Hex – специфика.
 - Задать программу амплификации и нажать **ОК**.

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	50 с	Fam, Hex	

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**B5701-FL**», указать количество образцов и нажать **ОК**.
5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.
6. Выбрать закладку **Запуск программы амплификации**, проверить параметры теста. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

ВНИМАНИЕ! Следите за тем, чтобы на стенках микропробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к

сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте стрипы/плашку при установке в прибор.

- Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют результаты амплификации участка ДНК HLA В*5701 и ВКО. Накопление продукта амплификации участка ДНК HLA В*5701 детектируется по каналу Hex, а накопление продукта амплификации ВКО – по каналу для детекции флуорофора Fam.

Обработка данных

- Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
- Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов**.
- Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
- Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить **Критерий положительного результата ПЦР - 70%**.
- Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.

Учет результатов в контрольных образцах

- Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в случае получения удовлетворительных результатов для положительных и отрицательных контролей амплификации и выделения ДНК (см. табл. 3).

Таблица 3

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроли	Контролируемый этап	Результат по значению Ct	
		Канал Fam	Канал Hex
ОК	Выделение ДНК	> вкладыш или отсутствует	отсутствует
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	< вкладыш (положительный)	< вкладыш (положительный)

Учет результатов в исследуемых клинических образцах

- Образец считается положительным**, если на канале Hex получен положительный результат и значение Ct не более чем на 5 циклов превышает

значение C_t на канале Fam.

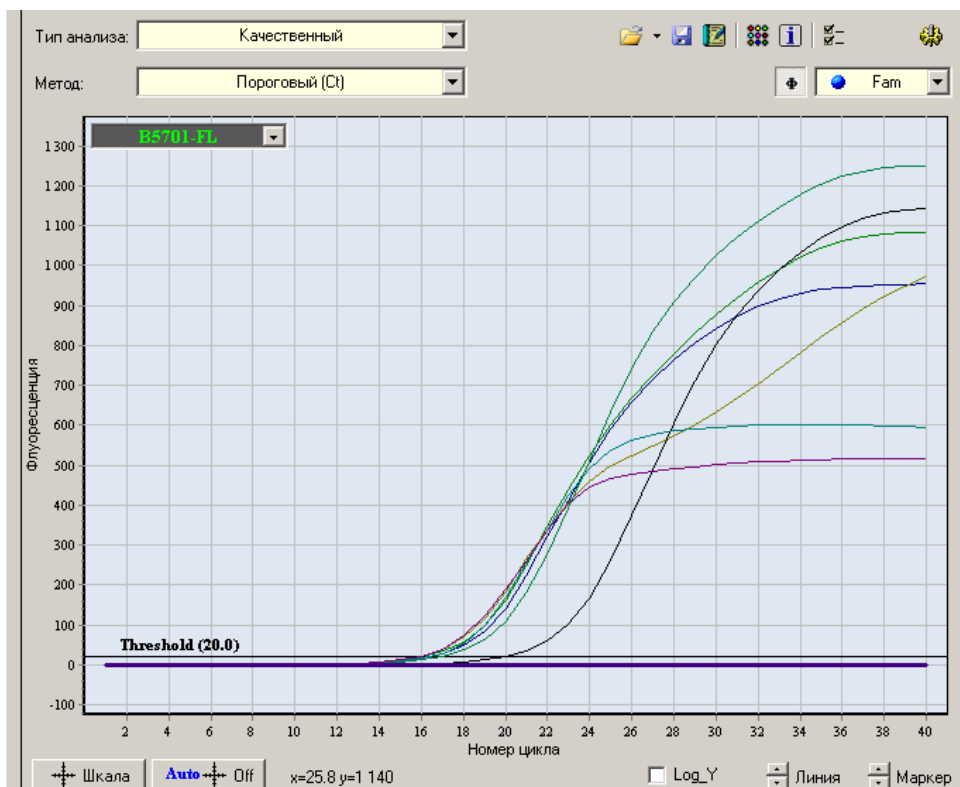
2. **Образец считается отрицательным**, если на канале Hex получен отрицательный результат или значение C_t превышает значение C_t на канале Fam более чем на 5.

Возможные ошибки

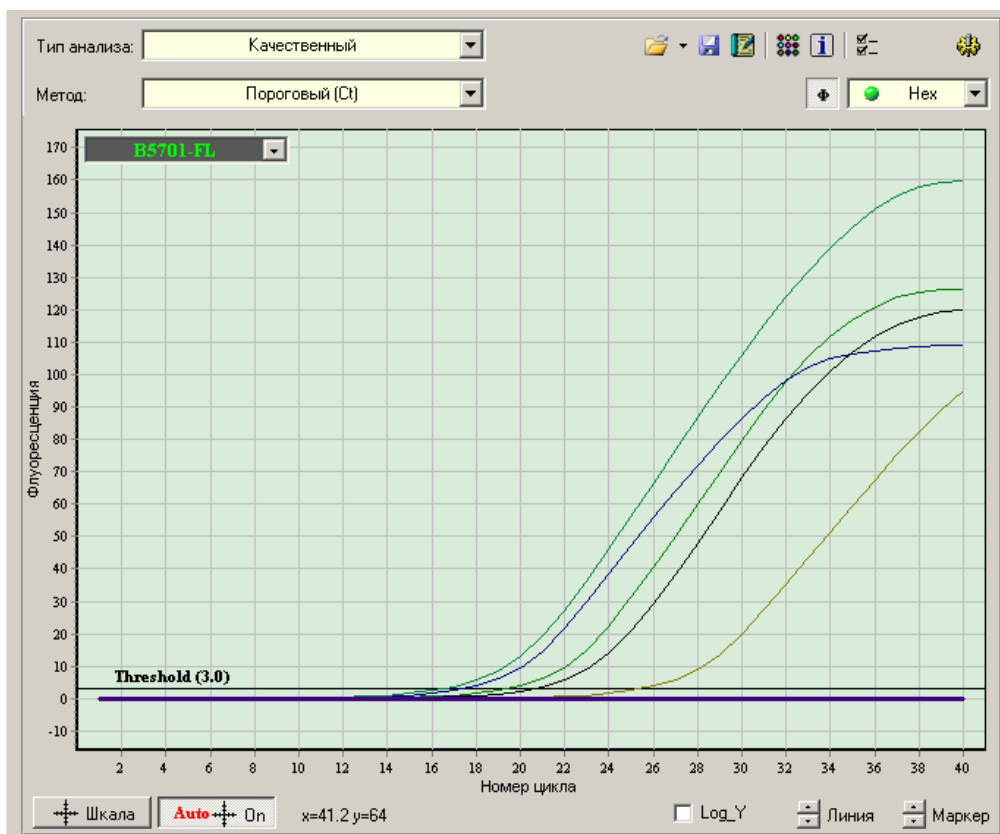
1. В пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по любому из каналов. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо повторное проведение анализа, начиная с этапа ПЦР.
2. В исследуемом образце не определено значение порогового цикла C_t по каналу ВКО. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
3. В исследуемом образце значение порогового цикла C_t по каналу ВКО более значения, указанного во вкладыше. В этом случае образец считается **сомнительным**. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
4. В отрицательном контроле ПЦР детектируется положительный сигнал по любому из каналов, что свидетельствует о контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.
5. В отрицательном контроле выделения детектируется положительный сигнал по каналу Hex (HLA B*5701), либо по каналу Fam (ВКО) значение порогового цикла C_t менее значения, указанного во вкладыше. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по каналу Fam – ВКО:



Данные по каналу Hex – образцы, содержащие специфическую мишень:



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ «Mx3000P», «Mx3005» («Stratagene», США)

1. Включить прибор и запустить программу **Stratagene Mx3000P**.
2. В окне **New Experiment Options** выберите пункт **Quantitative PCR (Multiple Standarts)** и установите флажок **Turn lamp on for warm-up**.

ВНИМАНИЕ! Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее **15 мин.**

3. Установить пробирки в прибор, закрыть фиксатор и дверцу прибора.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **FAM filter set** установить параметр FAM, напротив **HEX/JOE filter set** – JOE/HEX.
5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые микропробирки или стрипы и обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры FAM, JOE/HEX.
6. В окне **Well Information** внести имя для каждого исследуемого образца.
7. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации.

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	50 с	FAM, JOE/HEX (all points)	

8. Запустить программу амплификации, нажав кнопку **Run**, затем **Start**, и ввести имя файла.

Анализ результатов

Анализируют результаты амплификации участка ДНК HLA В*5701 и ВКО. Накопление продукта амплификации участка ДНК HLA В*5701 детектируется по каналу JOE/HEX, а накопление продукта амплификации ВКО – по каналу для детекции флуорофора FAM.

Обработка данных

1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.

2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедится, что все исследуемые образцы активны (ячейки соответствующие образцам должны иметь другой оттенок).
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога. Для этого в нижней панели **Dyes shown** активировать отображение каждого флуоресцентного канала в отдельности, просмотреть положение линии порога, и, при необходимости, изменить.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

1. Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в случае получения удовлетворительных результатов для положительных и отрицательных контролей амплификации и выделения ДНК (см. табл. 4).

Таблица 4

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроли	Контролируемый этап	Результат по значению C_t	
		Канал FAM	Канал JOE/HEX
ОК	Выделение ДНК	> вкладыш или отсутствует	отсутствует
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	< вкладыш (положительный)	< вкладыш (положительный)

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

1. **Образец считается положительным**, если на канале JOE/HEX получен положительный результат и значение C_t не более чем на 5 циклов превышает значение C_t на канале FAM.
2. **Образец считается отрицательным**, если на канале JOE/HEX получен отрицательный результат или значение C_t превышает значение C_t на канале FAM более чем на 5.

Возможные ошибки.

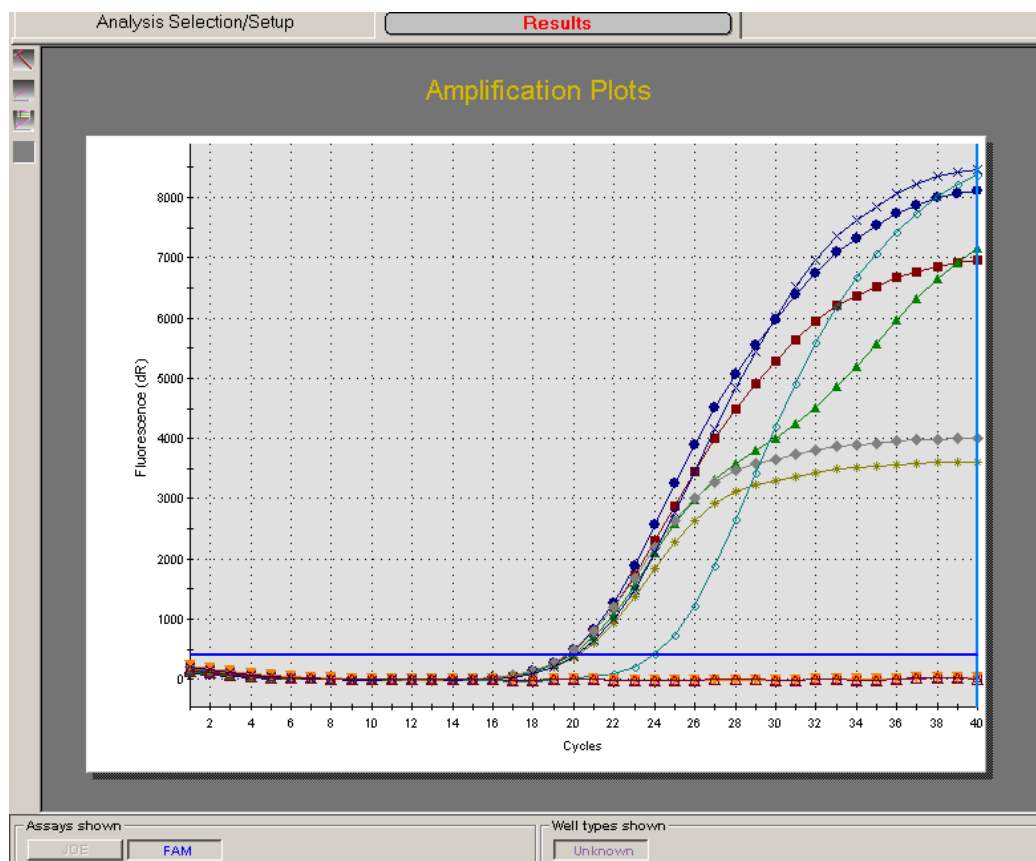
1. В пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по любому из каналов. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо повторное проведение анализа, начиная с этапа ПЦР.
2. В исследуемом образце не определено значение порогового цикла C_t по каналу ВКО. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического

материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.

3. В исследуемом образце значение порогового цикла C_t по каналу ВКО более значения, указанного во вкладыше. В этом случае образец считается сомнительным. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
4. В отрицательном контроле ПЦР детектируется положительный сигнал по любому из каналов, что свидетельствует о контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.
5. В отрицательном контроле выделения детектируется положительный сигнал по каналу JOE/HEX (HLA B*5701), либо по каналу FAM (ВКО) значение порогового цикла C_t менее значения, указанного во вкладыше. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по каналу FAM – ВКО:



Данные по каналу JOE/HEX – образцы, содержащие специфическую мишень:

