

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

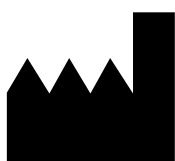
по применению набора реагентов

для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)
rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (*IL28B*) в
клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
в режиме «реального времени»

«АмплиСенс[®] Геноскрин-*IL28B*-FL»

Формат FRT

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	17

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (*IL28B*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Геноскрин-*IL28B-FL*» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

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
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR

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) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

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/Q/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей для проведения амплификации согласно инструкции к набору реагентов. При работе с приборами Rotor-Gene 3000/6000/Q рекомендуется использование прозрачных пробирок для ПЦР на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или пробирок на 0,1 мл.

Установить пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene 3000/6000/Q 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).

Программирование амплификатора:

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена пробиркой из текущего эксперимента, содержащей реакционную смесь «rs17».

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/Двухшаговый цикл**. 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)/закреплено фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000/Q). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Для приборов Rotor-Gene 6000/Q 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 (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа амплификации для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	40 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	

6. Нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**
- а) осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
- б) калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
- в) 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 программу амплификации, активировав **Start run/Старт**.
9. Присвоить название эксперименту 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 амплификации по каналу FAM/Green

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**) должны быть активированы 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 **30 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации по каналу JOE/Yellow

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 **30 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации по каналу ROX/Orange

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, 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 **30 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

А. Интерпретация результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs17»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **FAM/Green** и **ROX/Orange**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX/Orange** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат «**Обнаружен генотип TT**».
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **JOE/Yellow** и **ROX/Orange**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX/Orange** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат «**Обнаружен генотип GG**».
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определены значения *Ct* по каналам **FAM/Green**, **JOE/Yellow** и **ROX/Orange**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX/Orange** не превышает указанное во вкладыше, то SNP **rs8099917** выдается результат «**Обнаружен генотип TG**» только в том случае, если значение *Ct* по каналу **FAM/Green** превышает значение *Ct* по каналу **JOE/Yellow**. В том случае, если значение *Ct* по каналу **FAM/Green** меньше значения *Ct* по каналу **JOE/Yellow**, результат по каналу **JOE/Yellow** не учитывается и выдается результат «**Обнаружен генотип TT**».
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, не определены значения *Ct* по каналам **FAM/Green** и **JOE/Yellow**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение *Ct* по каналу **ROX/Orange** превышает указанное во вкладыше, независимо от

полученных результатов по каналам **FAM/Green** и **JOE/Yellow**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Б. Интерпретация результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs60»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **FAM/Green** и **ROX/Orange**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX/Orange** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат «**Обнаружен генотип ТТ**».
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **JOE/Yellow** и **ROX/Orange**, при этом, значение *Ct* по каналу **ROX/Orange** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат «**Обнаружен генотип СС**».
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определены значения *Ct* по каналам **FAM/Green**, **JOE/Yellow** и **ROX/Orange**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX/Orange** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат «**Обнаружен генотип СТ**» только в том случае, если значение *Ct* по каналу **FAM/Green** превышает значение *Ct* по каналу **JOE/Yellow**. В том случае, если значение *Ct* по каналу **FAM/Green** меньше значения *Ct* по каналу **JOE/Yellow**, результат по каналу **JOE/Yellow** не учитывается и выдается результат «**Обнаружен генотип ТТ**».
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси не определены значения *Ct* по каналам **FAM/Green** и **JOE/Yellow**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение *Ct* по каналу **ROX/Orange** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам **FAM/Green** и **JOE/Yellow**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей для проведения амплификации согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) (детекция через крышку пробирки).

Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

1. Открыть программу iQ5.
2. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

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

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать параметры амплификации (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	5 с	–	40
	60	50 с	FAM, JOE/HEX, ROX	

3. Дать название новому протоколу и сохранить его, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой

программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).

4. Задать схему расположения пробирок в планшете, для этого в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading**.
5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**. В опции **Select and load Fluorophores** для всех образцов задать измерение флюоресценции по каналам: FAM, HEX/JOE, ROX.
6. Задать объем реакции **Sample Volume 25 мкл**, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Амплификацию необходимо проводить с использованием такого же типа пластика, в котором проводилась калибровка прибора. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
7. Нажать кнопку **Run**. В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

Анализ результатов:

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
2. Выбрать режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию).
3. Просмотреть данные отдельно по каждому каналу для каждой ПЦР-смеси-1
ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить **индивидуально (!)**, выделив область пробирок, относящихся к данной ПЦР-смеси. Для этого активировать кнопку **Display Wells**, оставить активными образцы, исследованные с использованием одной из ПЦР-смесей-1. Образцы, исследованные с использованием другой смеси, сделать неактивными с помощью левой кнопки мыши. Нажать кнопку **OK**.
4. Установить уровень пороговой линии поочередно для каналов **FAM**, **JOE/HEX** и **ROX** на уровне **30 %** от максимального уровня флюоресценции в последнем цикле амплификации, зарегистрированного на соответствующем канале на анализируемой ПЦР-смеси-1. Для установки пороговой линии на определенном уровне необходимо перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши.
5. Для анализа результатов на данной ПЦР-смеси-1 активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).

6. Приступить к просмотру данных для другой ПЦР-смеси-1.

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

А. Интерпретация результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs17»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение C_t только по каналам **FAM** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип TT»**.
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение C_t только по каналам **JOE/HEX** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип GG»**.
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определены значения C_t по каналам **FAM**, **JOE/HEX** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу **ROX** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип TG»** только в том случае, если значение C_t по каждому из каналов **FAM** или **JOE/HEX** не более чем на **10 циклов** превышает значение C_t по каналу **ROX**. В том случае, если по одному из каналов **FAM** или **JOE/HEX** значение C_t более чем на **10 циклов** превышает значение C_t по каналу **ROX**, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат **«Обнаружен генотип GG»** или **«Обнаружен генотип TT»**.
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси не определены значения C_t по каналам **FAM** и **JOE/HEX**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение C_t по каналу **ROX** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам **FAM** и **JOE/HEX**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Б. Интерпретация результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs60»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение C_t только по каналам **FAM** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат **«Обнаружен генотип TT»**.

2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **JOE/HEX** и **ROX**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат **«Обнаружен генотип CC»**.
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определены значения *Ct* по каналам **FAM**, **JOE/HEX** и **ROX**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат **«Обнаружен генотип СТ»** только в том случае, если значение *Ct* по каждому из каналов **FAM** или **JOE/HEX** не более чем на **10 циклов** превышает значение *Ct* по каналу **ROX**. В том случае, если по одному из каналов **FAM** или **JOE/HEX** значение *Ct* более чем на **10 циклов** превышает значение *Ct* по каналу **ROX**, результат по этому каналу не учитывается и выдается результат **«Обнаружен генотип CC»** или **«Обнаружен генотип ТТ»**.
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, не определены значения *Ct* по каналам **FAM** и **JOE/HEX**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение *Ct* по каналу **ROX** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам **FAM** и **JOE/HEX**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей для проведения амплификации согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor - New** задать параметры амплификации (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала – см. табл.3). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

Таблица 3

Программа для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	50 с	FAM, HEX, ROX	

ВНИМАНИЕ: Для каждого шага этапов циклирования нажав на кнопку **Step Options** задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C per second**.

4. Сохранить протокол, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New** и задать имя файла. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой во вкладке **Protocol**, нажав на кнопку **Select Existing...**

Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.

5. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. В меню **Sample type** выбрать

Unknown, нажав на кнопку **Select Fluorophores...** выбрать галочками все флуорофоры, используемые в данной постановке и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов.

6. Сохранить схему планшета, выбрав **File** и далее **Save As** в окне «**Plate Editor New**» и задать имя файла. Выбрав или отредактировав нужную схему планшета, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.
7. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Из вкладки **Start Run** запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки.
8. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл.
2. Открыть вкладку **Quantification** (открывается по умолчанию), в которой представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.
3. Просмотреть данные отдельно по каждому каналу для каждой ПЦР-смеси-1.
ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить **индивидуально (!)**, выделив область пробирок, относящихся к данной ПЦР-смеси. Для этого в зоне, отображающей расположение пробирок в модуле, оставить активными образцы, исследованные с использованием одной из ПЦР-смесей-1. Образцы, исследованные с использованием другой смеси, сделать неактивными с помощью левой кнопки мыши.
4. Установить уровень пороговой линии поочередно для каналов **FAM**, **HEX** и **ROX** на уровне **30 %** от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации, зарегистрированного на соответствующем канале на анализируемой ПЦР-смеси-1. Для установки пороговой линии на определенном уровне необходимо перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши.
5. Нажать на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...** и при необходимости в появившемся окне задать название образцов.
6. Для формирования отчета о постановке на анализируемой ПЦР-смеси-1 необходимо нажать на кнопку панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и

сохранить сформированный документ.

7. Приступить к просмотру данных для другой ПЦР-смеси-1.

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

А. Интерпретация результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs17»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение C_t только по каналам **FAM** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип TT»**.
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение C_t только по каналам **HEX** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип GG»**.
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определены значения C_t по каналам **FAM**, **HEX** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу **ROX** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип TG»** только в том случае, если значение C_t по каждому из каналов **FAM** или **HEX** не более чем на **10 циклов** превышает значение C_t по каналу **ROX**. В том случае, если по одному из каналов **FAM** или **HEX** значение C_t более чем на **10 циклов** превышает значение C_t по каналу **ROX**, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат **«Обнаружен генотип GG»** или **«Обнаружен генотип TT»**.
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси не определены значения C_t по каналам **FAM** и **HEX**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение C_t по каналу **ROX** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам **FAM** и **HEX**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Б. Интерпретация результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs60»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение C_t только по каналам **FAM** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860**

выдается результат **«Обнаружен генотип ТТ»**.

2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **HEX** и **ROX**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат **«Обнаружен генотип СС»**.
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определены значения *Ct* по каналам **FAM**, **HEX** и **ROX**, при этом значение *Ct* по каналу **ROX** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат **«Обнаружен генотип СТ»** только в том случае, если значение *Ct* по каждому из каналов **FAM** или **HEX** не более чем на **10 циклов** превышает значение *Ct* по каналу **ROX**. В том случае, если по одному из каналов **FAM** или **HEX** значение *Ct* более чем на **10 циклов** превышает значение *Ct* по каналу **ROX**, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат **«Обнаружен генотип СС»** или **«Обнаружен генотип ТТ»**.
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси не определены значения *Ct* по каналам **FAM** и **HEX**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение *Ct* по каналу **ROX** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам **FAM** и **HEX**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей для проведения амплификации согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) (детекция через крышку пробирки).

Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3.4.0. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.

1. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
2. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – **IL28B** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – пороговый (Ct);
 - **Пробирки** – отметить галочкой **Образец**;
 - **Контроли** – нет;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл;
 - **Флуорофоры** – Fam – специфика; Hex – специфика; Rox – ВК.
 - Задать программу амплификации (см. табл. 4) с применением команды **Создать новую программу/редактировать программу** и нажать **ОК**.

Таблица 4

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	50 с	Fam, Hex, Rox	

3. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название теста **IL28B**, указать количество образцов и нажать **ОК**.

4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы **Протокол проведения ПЦР**. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора в окне **Свободное заполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
5. Указать **Объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
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! Следить за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивать стрипы при установке в прибор.

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

Анализ результатов

1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct (Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Отключить **Фитирование (сглаживание) данных** при помощи кнопки **Ф** (отжать кнопку).
5. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**. В открывшейся вкладке установить **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**. Опцию **Нормализация данных** не использовать (галочка в соответствующем окне должна отсутствовать). Нажать кнопку **Применить**.
6. Просмотреть данные отдельно по каждому каналу для каждой ПЦР-смеси-1.

ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить **индивидуально (!)**, выделив область пробирок, относящихся к данной ПЦР-смеси. Для этого активировать кнопку (**«Изменить расположение и цветовую гамму пробирок»**), оставить активными образцы, исследованные с использованием одной из ПЦР-смесей-1. Образцы, исследованные с использованием другой смеси, сделать неактивными с помощью левой кнопки мыши.

7. Установить уровень пороговой линии поочередно для каждого из каналов на определенном уровне в соответствии с таблицей 4. Уровень пороговой линии устанавливается от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации, зарегистрированного на соответствующем канале на

анализируемой ПЦР-смеси-1. Для установки пороговой линии на определенном уровне необходимо ее перетащить курсором при нажатой левой кнопке мыши.

8. Для формирования отчета о постановке на анализируемой ПЦР-смеси-1 нажать кнопку **Отчет**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат *MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML, выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.
9. Приступить к просмотру данных для другой ПЦР-смеси-1.

Таблица 5

Реакционная смесь	«rs17»	«rs60»
Канал	Уровень пороговой линии от максимального уровня флуоресценции	
Fam	30 %	30 %
Hex	40 %	30 %
Rox	30 %	30 %

Интерпретация результатов в исследуемых клинических образцах

А. Интерпретация результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs17»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **Fam** и **Rox**, при этом значение *Ct* по каналу не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип TT»**.
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **Hex** и **Rox**, при этом значение *Ct* по каналу **Rox** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип GG»**.
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определены значения *Ct* по каналам **Fam**, **Hex** и **Rox**, при этом значение *Ct* по каналу **Rox** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип TG»** только в том случае, если значение *Ct* по каждому из каналов **Fam** или **Hex** не более чем на **15 циклов** превышает значение *Ct* по каналу **Rox**. В том случае, если по одному из каналов **Fam** или **Hex** значение *Ct* более чем на **15 циклов** превышает значение *Ct* по каналу **Rox**, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат **«Обнаружен генотип GG»** или **«Обнаружен генотип TT»**.
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси не

определены значения *Ct* по каналам **Fam** и **Hex**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение *Ct* по каналу **Rox** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам **Fam** и **Hex**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Б. Интерпретация результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs60»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **Fam** и **Rox**, при этом значение *Ct* по каналу **Rox** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат **«Обнаружен генотип ТТ»**.
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определено значение *Ct* только по каналам **Hex** и **Rox**, при этом значение *Ct* по каналу **Rox** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат **«Обнаружен генотип СС»**.
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси определены значения *Ct* по каналам **Fam**, **Hex** и **Rox**, при этом значение *Ct* по каналу **Rox** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат **«Обнаружен генотип СТ»** только в том случае, если значение *Ct* по каждому из каналов **Fam** или **Hex** не более чем на **15 циклов** превышает значение *Ct* по каналу **Rox**. В том случае, если по одному из каналов **Fam** или **Hex** значение *Ct* более чем на **15 циклов** превышает значение *Ct* по каналу **Rox**, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат **«Обнаружен генотип СС»** или **«Обнаружен генотип ТТ»**.
4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси не определены значения *Ct* по каналам **Fam** и **Hex**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение *Ct* по каналу **Rox** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам **Fam** и **Hex**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.