

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы
человека (ВПЧ) 6 и 11 генотипов в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ВПЧ 6/11-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 ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США).....	19
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).....	25
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFХ96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	29
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	32

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 6 и 11 генотипов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® ВПЧ 6/11-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000 (четырёхканальный), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, 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 – 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.

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или пробирок на 0,1 мл.

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки в ротор амплификатора 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).

ВНИМАНИЕ! Если вы не полностью заполняете ротор прибора, то его следует уравновесить. Для этого заполните незанятые места пустыми пробирками (*не используйте пробирки от предыдущих экспериментов*). Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
5. 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). Нажать кнопку **Next/Далее**.
6. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси:

Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл для варианта FRT-100 F, 30 мкл для варианта FRT. Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

7. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать параметры амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling1/ Циклирование1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling2/ Циклирование2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Если данный комплект реагентов используется совместно с набором реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL», то возможно использование единой программы амплификации для приборов роторного типа.

Этап	Температура, °C	Время	Число повторов циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	1
Hold2/Удерж. темп-ры2	65	2 мин	1
Cycling1/ Циклирование1	95	20 с	5
	64 <u>Touchdown:</u> 1 deg. per cycle / Снизать темп-ру шага на 1 градус каждый цикл	25 с	
	65	55 с	
Cycling2/ Циклирование2	95	15 с	40
	60	25 с	
	65	25 с детекция флуоресц. сигнала	

8. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
9. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**

- а) осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - б) установить калибровки каналов FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (нажать кнопку **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Автоматизация уровня сигнала**, указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал – 4**, **Max Reading/Максим. Сигнал – 8**);
 - в) осуществлять калибрование по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange перед первым измерением (отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
10. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
 11. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
 12. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К-», положительный – «К+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **Negative control/Отрицательный контроль**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

По каналам FAM/Green и JOE/Yellow детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу ROX/Orange детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ результатов:

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать; Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать** и **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии для каждого из основных открывшихся окон (FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange) **Threshold/Порог**.
3. Выберите линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,03**.
6. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quantitation Results**) появятся значения *Ct*.
8. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены следующие результаты прохождения контрольных образцов:
 - в отрицательном контроле (В-) экстракции – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК ВПЧ 6, 11 типов и ДНК человека** – должно появиться значение *Ct* по каждому каналу.
9. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с граничными значениями *Ct*, указанными во вкладыше к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие граничное значение порогового цикла, указанное во вкладыше, считаются положительными.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

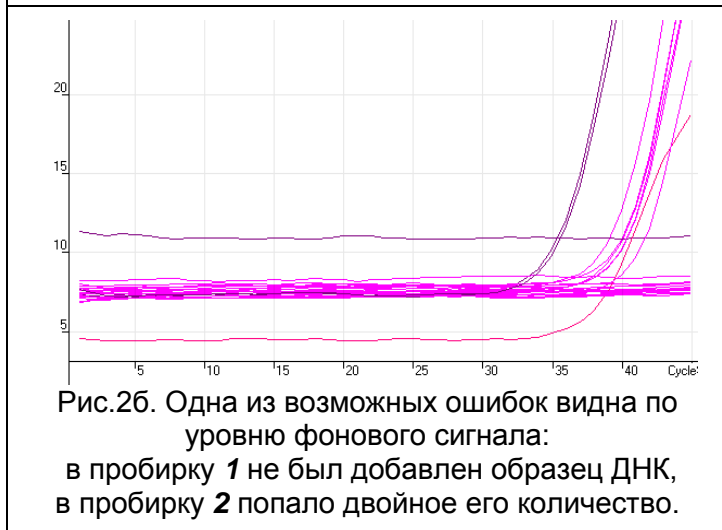
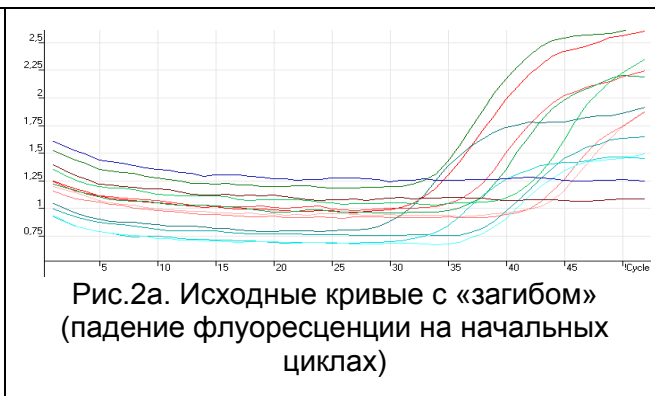
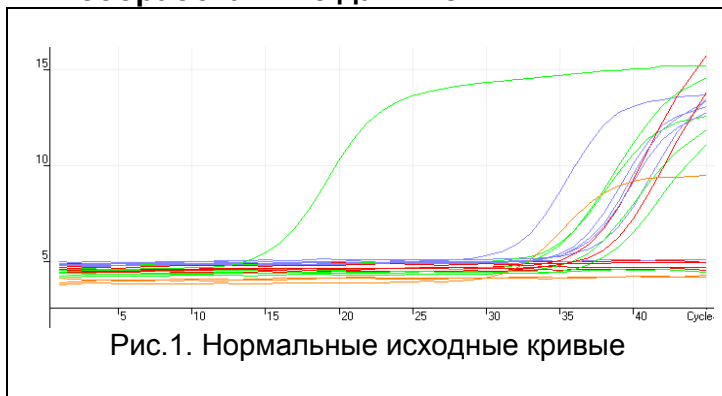
Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
Отрицательные образцы анализируются программой Rotor-Gene как положительные	Неправильная математическая обработка отрицательных образцов при наличии участка падения флуоресценции на начальных циклах (рис. 2а)	Типичный положительный образец имеет характерную S-образную кривую накопления флуоресценции (рис. 1, 3-5). Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид довольно прямых линий, идущих снизу вверх (рис. 7)	Необходимо воспользоваться функцией Ignore First/Игнор. первые выбрав значение 5 циклов. Если это не приводит к должному результату попробуйте увеличить это значение на 1-5.
	Пересечение линией порога нисходящих кривых флуоресценции на начальных циклах (рис. 6)	На графике обработанных кривых флуоресценции красная линия порога (Threshold) пересекает или «задевает» кривые флуоресценции в левой части графика (первые циклы) (рис. 6)	воспользуйтесь функцией Eliminate cycles before.../Исключить циклы до... , задав значение 5, (игнорируется пересечение порога и кривой флуоресценции на первых 5 циклах)
Снижение чувствительности и из-за загрязнения линз прибора	Загрязнение линз ведет к снижению эффективности возбуждения и регистрации флуоресценции, что в первую очередь сказывается на образцах с малым количеством специфичной ДНК, дающих малое увеличение флуоресценции	Низкие значения фонового сигнала по всем 4 каналам измерения флуоресценции (<1) при максимальном значении множителя gain (10).	Проводить очистку горизонтальной и вертикальной линз прибора сухим одноразовым ватным тампоном не реже 1 раза в месяц
Снижение чувствительности и из-за разрушения зондов	Неправильное хранение или эксплуатация реагентов комплекта (повышенная температура, многократное открывание пробирок со смесями, работа в «грязных» условиях) могут приводить к разрушению олигонуклеотидов	Разрушение зондов может быть выявлено только при сравнении данных экспериментов в начале и по прошествии определенного времени использования реагентов или при сравнении с адекватно хранящимися реагентами <u>той же серии</u> . Выявляется по снижению значения автоматически выбираемого коэффициента умножения gain в разных экспериментах более чем на 2 единицы (при использовании <u>одного и того же прибора</u>).	Использовать смеси, хранившиеся в адекватных условиях с неистекшим сроком годности (см. Срок годности. Условия транспортирования и хранения)

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
		ВНИМАНИЕ! эффект увеличения умножителя gain может также наблюдаться после очистки линз прибора от сильного загрязнения	
Снижение чувствительности и из-за снижения активности полимеразы (TaqF)	Неправильное хранение полимеразы или внесение «грязи» приводит к разрушению фермента	Выявляется по непрохождению положительного контроля или если значение порогового цикла положительного контроля выше порога слабых образцов	Использовать адекватно хранящийся (см. Срок годности. Условия транспортирования и хранения) или новый фермент.

Примечание – Информацию по всем установленным параметрам эксперимента, а так же отчет по автокалибровке можно найти, просмотрев установки эксперимента (кнопка **Settings/Установки**). В частности, вкладка **Messages/Сообщения** пункт **Autocalibration Log Messages** – отчет об автокалибровке.

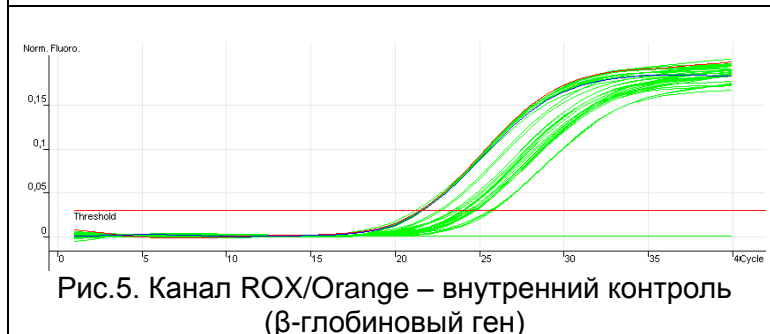
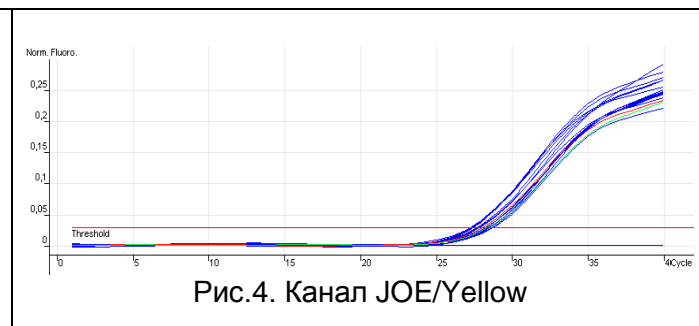
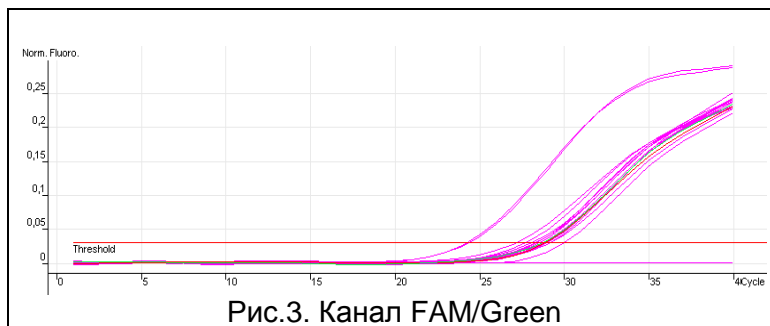
Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
В пробирку не внесено/внесено меньше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно превосходит другие (видно на необработанных кривых) (рис. 2б). Образец отрицательный.	Повторное исследование образца начиная с этапа ПЦР
В пробирку не внесено/внесено меньше реакционной смеси или внесено больше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно ниже других (видно на необработанных кривых) (рис. 2б).	Если образец отрицательный, требуется повторное исследование
Не задан параметр автокалибровки от 4FI до 8FI или ошибка в первой пробирке барабана (ее отсутствие, неправильное внесение образца ДНК или реакционной смеси)	Большинство фоновых сигналов флуоресценции меньше 1 или больше 20	Задать параметр при следующем запуске. Если произошел «зашкал» или сигналы очень слабые (при обработке нет положительных сигналов, фон меньше 0,5) необходим повтор исследования начиная с этапа ПЦР
При приготовлении смеси реагентов не внесена полимеразы (TaqF)	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование с правильно приготовленными смесями начиная с этапа ПЦР

Необработанные данные

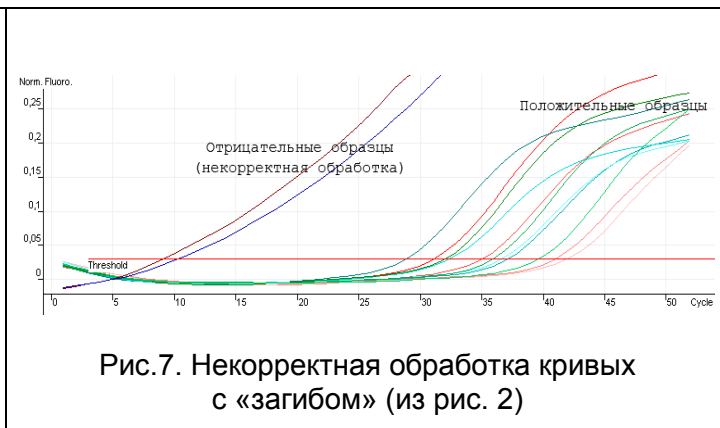
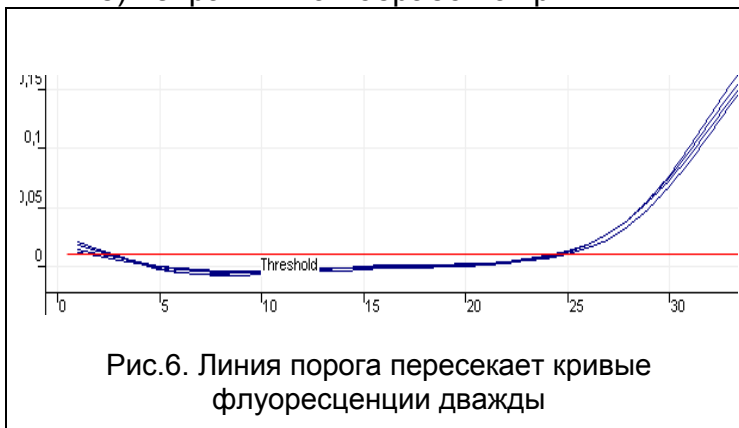


Обработанные данные

а) нормальные кривые после обработки (типичный S-образный вид, линия порога пересекает кривые только в области накопления флуоресценции)



б) неправильная обработка кривых



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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных пробирок на 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция через крышку пробирки).

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

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

ВНИМАНИЕ! Следите 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 переворачивайте стрипы при установке в прибор.

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала:
 - для прибора **iCycler iQ5** в окне ***Selected Plate Setup*** модуля ***Workshop*** нажать кнопку ***Create New*** или ***Edit***. Редактировать схему планшета возможно в режиме ***Whole Plate loading***. Задать объем реакции (***Sample Volume***) **25 мкл** для варианта **FRT-100 F**, **30 мкл** для варианта **FRT**, тип крышек (***Seal Type***): ***Domed Cap***, тип пробирок (***Vessel Type***): ***Tubes***. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам **FAM**, **JOE/HEX** и **ROX**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку ***Save&Exit Plate Editing***.
 - для прибора **iCycler iQ** в окне ***Edit Plate Setup*** модуля ***Workshop*** в опции ***Samples: Whole Plate Loading*** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне ***Sample Identifier***. В опции ***Select and load Fluorophores*** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM-490**, **JOE-530** и **ROX-575**.

Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением «.pts») и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованный ранее **Plate Setup**, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением «.pts») и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

2. Все клинические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-».
3. Задать программу амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530, ROX/ROX-575	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Если данный комплект реагентов используется совместно с набором реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL», то возможно использование единой программы амплификации для приборов планшетного типа.

Этап	Температура, °С	Время	Число повторов циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	1
Cycling1/ Циклирование2	95	15 с	6
	65	55 с	
	65	25 с	
Cycling2/ Циклирование 2	95	15 с	41
	60	55 с детекция флуоресц. сигнала	
	65	25 с	

- для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задайте параметры амплификации и сохраните

протокол, 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**).

- для прибора **iCycler iQ** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать программу амплификации, а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 2 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (файл с расширением «.tmo») и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

4. Перед запуском выполнения программы:

- для прибора **iCycler iQ5** необходимо проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- для прибора **iQ iCycler** в окне **Run Prep** необходимо проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume – 25** мкл для варианта **FRT-100 F**, **30** мкл для варианта **FRT**. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

5. После окончания программы приступить к анализу результатов.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

По каналам FAM/FAM-490 и JOE/HEX/JOE-530 детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу ROX/ROX-575 детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с

пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ данных

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого:
 - для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**;
 - для прибора **iQ iCycler** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyse Data**.
2. Просмотреть полученные данные. Для этого:
 - для прибора **iCycler iQ5** выбрать режим анализа данных **Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию);
 - для прибора **iQ iCycler** на вкладке **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок соответствующего канала. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию).
3. Просматривайте данные отдельно по каждому каналу.
4. Установить уровень пороговой линии. Для этого:
 - для прибора **iCycler iQ5** в окне **Base Line Threshold** установите параметр **Base Line Cycles – Auto Calculated** (в случае «заваливания» кривых установить данный параметр в режим **User Defined, 2 through 10 cycles**), параметр **Crossing Threshold – Auto Calculated**. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов;
 - для прибора **iQ iCycler** в меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим автоматической установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **Auto Calculated**. В норме пороговая

линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, то в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined** и повысить уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов.

5. Для анализа результатов нажать кнопку **PCR Quant (iCycler iQ)** или активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (**iCycler iQ5**).
6. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены следующие результаты прохождения контрольных образцов:
 - в отрицательном контроле (В-) экстракции – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК ВПЧ 6, 11 типов и ДНК человека** – должно появиться значение *Ct* по всем каналам.
7. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с граничными значениями *Ct*, указанными во вкладыше к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие граничное значение порогового цикла, указанное во вкладыше, считаются положительными.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
Снижение чувствительности из-за разрушения зондов	Неправильное хранение или эксплуатация реагентов комплекта (повышенная температура, многократное открывание пробирок со смесями, работа в «грязных» условиях) могут приводить к	Разрушение зондов может быть выявлено только при сравнении данных экспериментов в начале и по прошествии определенного времени использования реагентов или при сравнении с адекватно хранящимися реагентами той же серии . Выявляется по увеличению значения фоновой флуоресценции (флуоресценция в начале эксперимента, оценивается в режиме Background subtracted) в разных экспериментах более чем в 2 раза (при использовании <u>одного и того же</u>	Использовать смеси, хранившиеся в адекватных условиях с неистекшим сроком годности (см. Срок годности. Условия транспортирования и хранения)

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
	разрушению олигонуклеотидов	прибора). ВНИМАНИЕ! эффект увеличения флуоресценции может также наблюдаться после смены лампы, перекалибровки, очистки оптической системы прибора	
Снижение чувствительности из-за снижения активности полимеразы (TaqF)	Неправильное хранение полимеразы или внесение «грязи» приводит к разрушению фермента	Выявляется по непрохождению положительного контроля или если значение порогового цикла положительного контроля значительно выше обычного	Использовать адекватно хранящийся (см. Срок годности. Условия транспортирования и хранения) или новый фермент.

Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
В пробирку не внесено/внесено меньше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно превосходит другие (видно на необработанных кривых – режим отображения Background subtracted). Образец отрицательный.	Повторное исследование образца
В пробирку не внесено/внесено меньше реакционной смеси или внесено больше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно ниже других (видно на необработанных кривых – режим отображения Background subtracted)	Если образец отрицательный, требуется повторное исследование
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид)	Установить линию порога так, чтобы она пересекала только сигмообразные кривые накопления флуоресценции или на высоте $\frac{1}{4}$ от высоты между конечным значением флуоресценции отрицательных и положительных образцов
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции (рис. 2)	Вызвав окно BaseLine Threshold (правая кнопка мыши на графике флуоресценции) задать диапазон расчета базовой линии, начиная с первого после ступени цикла
При приготовлении смеси реагентов не внесена полимеразы (TaqF)	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование с правильно приготовленными смесями

Необработанные данные (режим отображения *Background subtracted*).

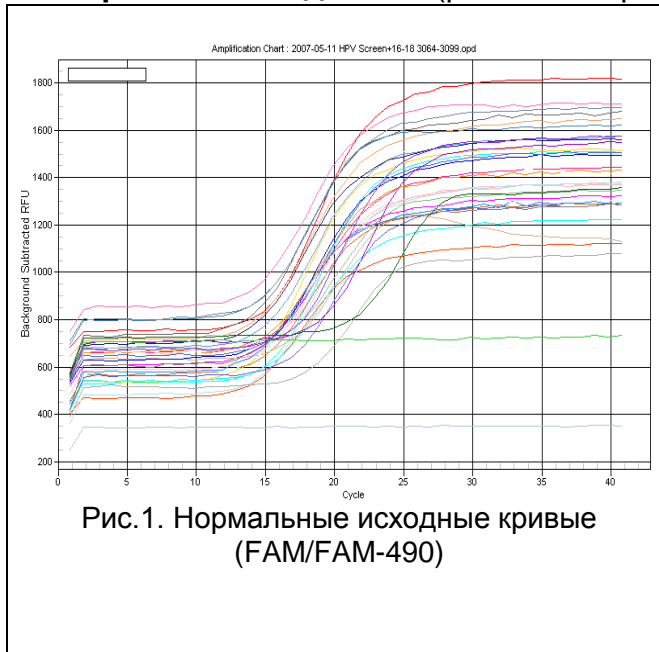


Рис.1. Нормальные исходные кривые (FAM/FAM-490)

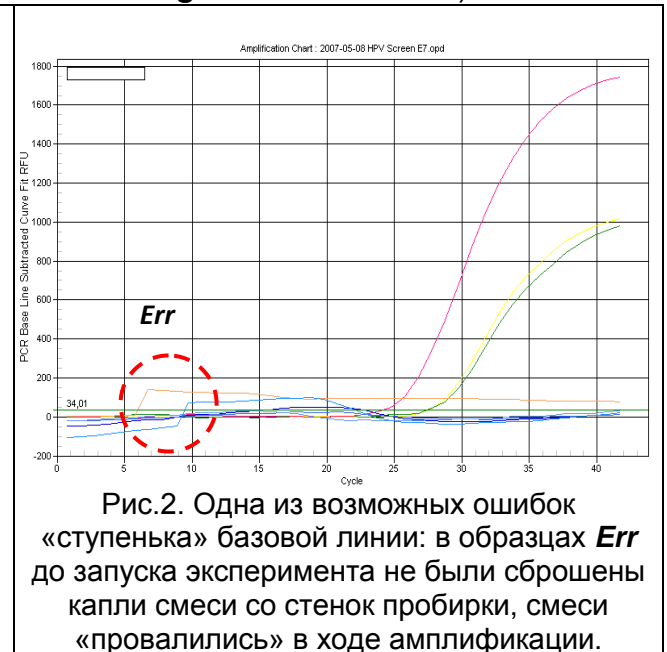


Рис.2. Одна из возможных ошибок «ступенька» базовой линии: в образцах **Err** до запуска эксперимента не были сброшены капли смеси со стенок пробирки, смеси «провалились» в ходе амплификации.

Обработанные данные

Нормальные кривые после обработки, типичный S-образный вид, правильное расположение порогов (Режим отображения *PCR Base Line Subtracted Curve Fit*)

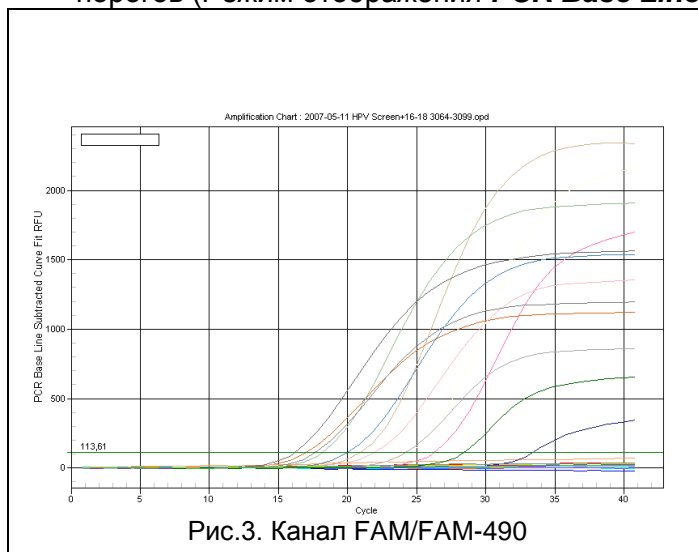


Рис.3. Канал FAM/FAM-490

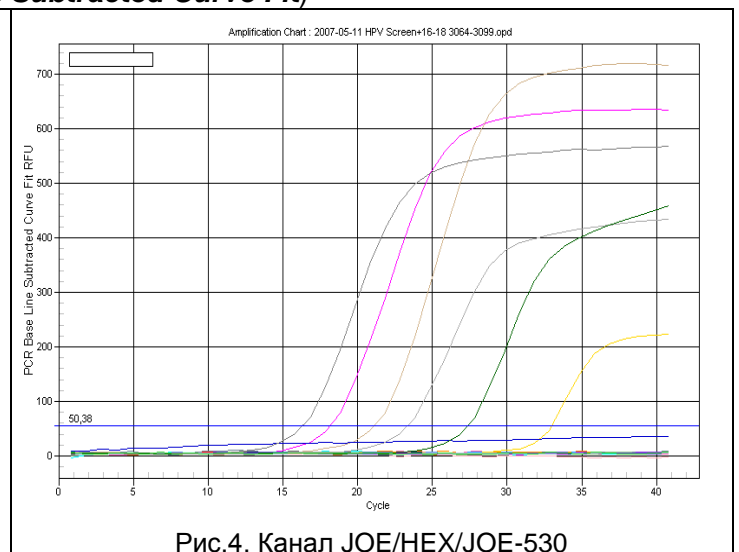


Рис.4. Канал JOE/HEX/JOE-530

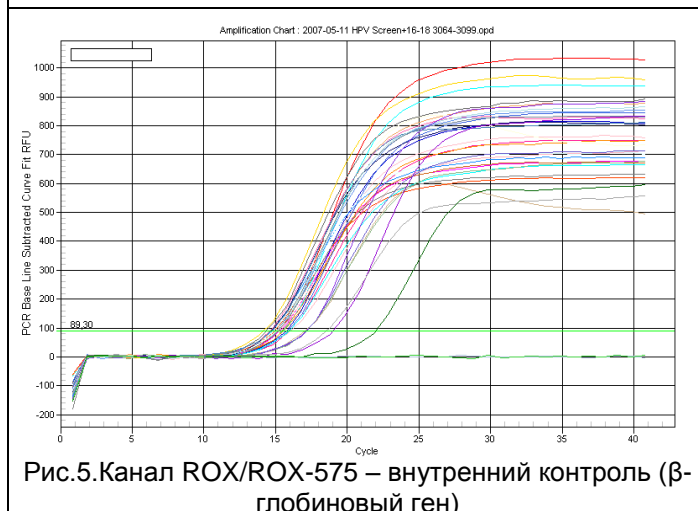


Рис.5. Канал ROX/ROX-575 – внутренний контроль (β-глобиновый ген)

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция через крышку пробирки).

1. Включите прибор, запустите программу Mx3000P/Mx3005P.
2. В окне **New Experiment Options** выберите пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установите флажок **Turn lamp on for warm-up**.

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

3. Установите пробирки в прибор, закройте фиксатор и дверцу прибора.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **HEX/JOE filter set** установить параметр JOE, напротив пункта **FAM filter set** установить параметр FAM, напротив пункта **ROX filter set** установить параметр ROX.

ВНИМАНИЕ! Следите 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 переворачивайте стрипы/плашку при установке в прибор.

5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - а) выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью).
 - б) Обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** установить три флажка FAM, JOE и ROX. Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно **Well Information**). Внести подписи образцов также можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню **Plate Setup**.

Задайте программу амплификации. Для этого используйте один из следующих способов:

Использование шаблонного файла для задания программы амплификации (рекомендуется).

Перейдите на вкладку **Thermal Profile Setup**. Нажмите кнопку **Import...** справа от изображения профиля термоциклирования. Перейдите в папку, содержащую

предшествующий экспериментальный файл, и откройте его. В окне **Thermal Profile** появится необходимый профиль термоциклирования.

Самостоятельное программирование

1. Во вкладке **Plate Setup** выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки. Перейти в меню **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Если данный комплект реагентов используется совместно с набором реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL», то возможно использование единой программы амплификации для приборов планшетного типа.

Этап	Температура, °С	Время	Число повторов циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	1
Hold2/Удерж. темп-ры2	65	2 мин	1
Cycling1/ Циклирование1	95	20 с	5
	64 <u>Touchdown:</u> 1 deg. per cycle / Снизить темп-ру шага на 1 градус каждый цикл	25 с	
	65	55 с	
Cycling2/ Циклирование 2	95	20 с	40
	60	25 с	
	65	55 с детекция флуоресц. сигнала	

2. Для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию **All points** для параметра **Data collection marker by dragging** и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.

3. Запустить амплификацию, нажав кнопку **Run**, затем **Start** и присвоив имя файлу эксперимента.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

По каналам FAM и JOE/HEX детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу ROX детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ данных

1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок). В противном случае выбрать все исследуемые образцы, удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.
3. Перейти во вкладку **Results**.
4. Убедиться, что три флуоресцентных канала активны (кнопки **JOE**, **FAM** и **ROX** нажаты в поле **Assays Shown** внизу окна программы).
5. В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив трех флуоресцентных каналов: JOE/HEX, FAM и ROX. Проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысить уровень порога. По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, дважды щелкните левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне **Graph properties** для оси Y (**Y axis**) поставьте галочку в поле **Scale** напротив пункта **Log**.
6. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том

случае, когда получены следующие результаты прохождения контрольных образцов:

- в отрицательном контроле (В-) экстракции – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений C_t ,
- в отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений C_t ,
- в положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК ВПЧ 6, 11 типов и ДНК человека** – должно появиться значение C_t по всем каналам.

7. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с граничными значениями C_t , указанными во вкладыше к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения C_t , не превышающие граничное значение порогового цикла, указанное во вкладыше, считаются положительными.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ОШИБКИ

Возможные проблемы	Причина	Как выявить?	Способы устранения
Снижение чувствительности из-за разрушения зондов	Неправильное хранение или эксплуатация реагентов комплекта (повышенная температура, многократное открывание пробирок со смесями, работа в «грязных» условиях) могут приводить к разрушению олигонуклеотидов	Разрушение зондов может быть выявлено только при сравнении данных экспериментов в начале и по прошествии определенного времени использования реагентов или при сравнении с адекватно хранящимися реагентами <u>той же серии</u> . Выявляется по увеличению значения фоновой флуоресценции (флуоресценция в начале эксперимента, оценивается в режиме R) в разных экспериментах более чем в 2 раза (при использовании <u>одного и того же</u> прибора). ВНИМАНИЕ! эффект увеличения флуоресценции может также наблюдаться после очистки оптической системы прибора	Использовать смеси, хранившиеся в адекватных условиях с неистекшим сроком годности (см. Срок годности. Условия транспортирования и хранения)
Снижение чувствительности из-за снижения активности полимеразы (TaqF)	Неправильное хранение полимеразы или внесение «грязи» приводит к разрушению фермента	Выявляется по непрохождению положительного контроля или если значение порогового цикла положительного контроля выше порога слабых образцов	Использовать адекватно хранившийся (см. Срок годности. Условия транспортирования и хранения) или новый фермент.

Возможные ошибки	Признаки	Способ устранения
Контаминация специфичной ДНК	Появление сигнала по любому каналу в отрицательном контроле	Повторное проведение эксперимента, принятие мер по выявлению и устранению источника контаминации
В пробирку не внесено/внесено меньше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно превосходит другие (видно на необработанных кривых – режим отображения R – <i>multicomponent view</i>). Образец отрицательный.	Повторное исследование образца
В пробирку не внесено/внесено меньше реакционной смеси или внесено больше образца ДНК	Фоновый сигнал образца сильно ниже других (видно на необработанных кривых – режим отображения R – <i>multicomponent view</i>)	Если образец отрицательный, требуется повторное исследование
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид)	Установить линию порога так, чтобы она пересекала только сигмообразные кривые накопления флуоресценции или на высоте $\frac{1}{4}$ от высоты между конечным значением флуоресценции отрицательных и положительных образцов
При приготовлении смеси реагентов не внесена полимеразы (TaqF)	Ни в одном образце, включая положительный контроль, не регистрируется ни один положительный сигнал	Повторное исследование с правильно приготовленными смесями

Необработанные данные (режим отображения R)

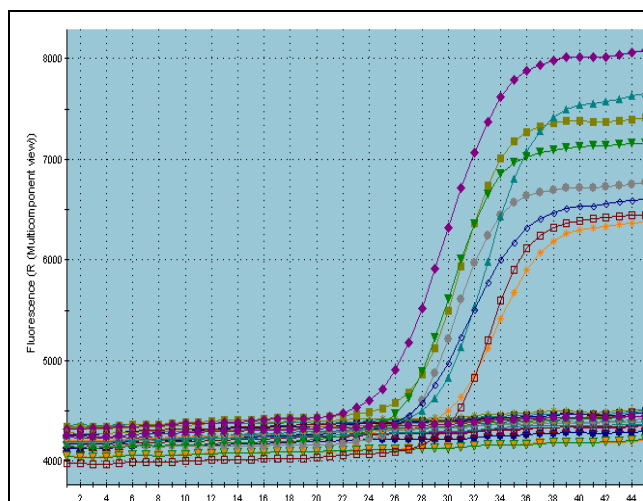


Рис.1. Нормальные исходные кривые

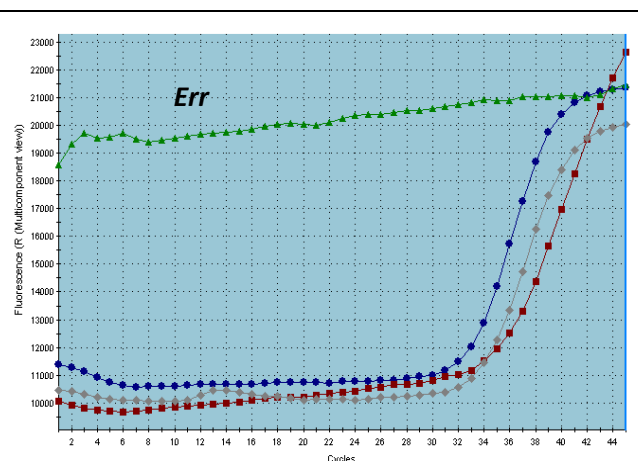


Рис.2. Одна из возможных ошибок видна по уровню фонового сигнала: в пробирку **Err** не был добавлен образец ДНК.

Обработанные данные

Нормальные кривые после обработки, режим **dR** (типичный S-образный вид)

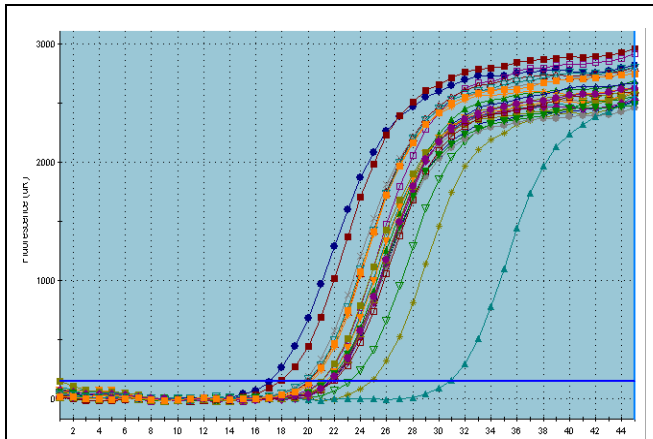


Рис.3. Канал FAM

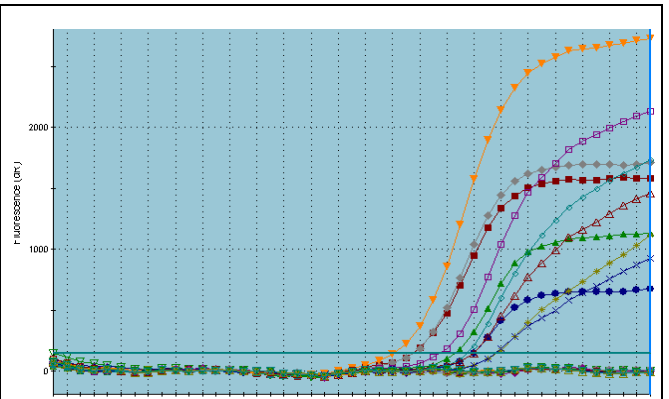


Рис.4. Канал JOE/HEX

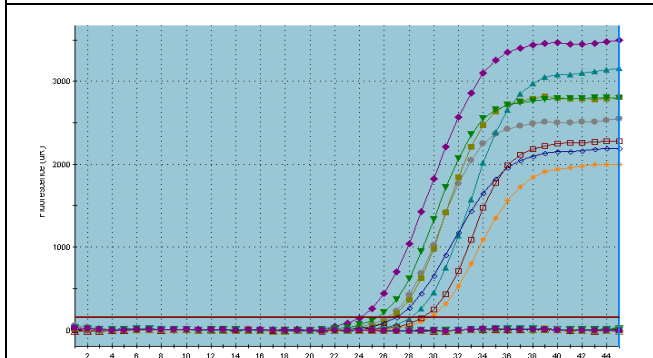


Рис.5. Канал ROX – внутренний контроль (β -глобиновый ген)

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. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция через крышку пробирки).

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 – **ВПЧ 6/11** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - Тип – качественный;
 - Метод – Пороговый (Ct);
 - Пробирки – образец, контроль +, контроль – ;
 - Контроли: положительный (К+) – 1 , отрицательный (К-) – 1;
 - Объем рабочей смеси в пробирке – **25 мкл для варианта FRT-100 F, 30 мкл для варианта FRT**;
 - Флуорофоры – Fam, Hex – специфика, Rox – ВКО.
 - Задать программу амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	Число повторов циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	1
Cycling1/ Циклирование1	95	5 с	5
	60	20 с	
	72	15 с	
Cycling2/ Циклирование 2	95	5 с	40
	60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с	

ВНИМАНИЕ! Если данный комплект реагентов используется совместно с набором реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL», то возможно использование единой программы амплификации для приборов планшетного типа.

Этап	Температура, °C	Время	Число повторов циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	1
Cycling1/ Циклирование1	95	15 с	6
	65 Touchdown: 1 deg. per cycle	55 с	
	65	25 с	
Cycling2/ Циклирование 2	95	15 с	41
	60	55 с детекция флуоресц. сигнала	
	65	25 с	

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **ВПЧ 6/11-FL**, указать количество образцов и нажать **OK**
 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 пробирок 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.**
7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ДАННЫХ

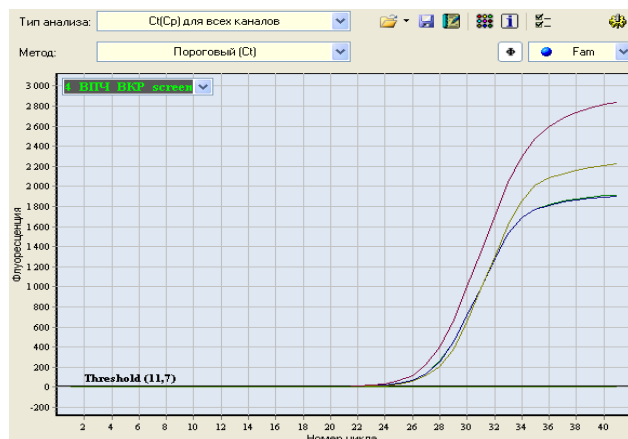
По каналам Fam и Hex детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу Rox детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β -глобинового гена). Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ данных

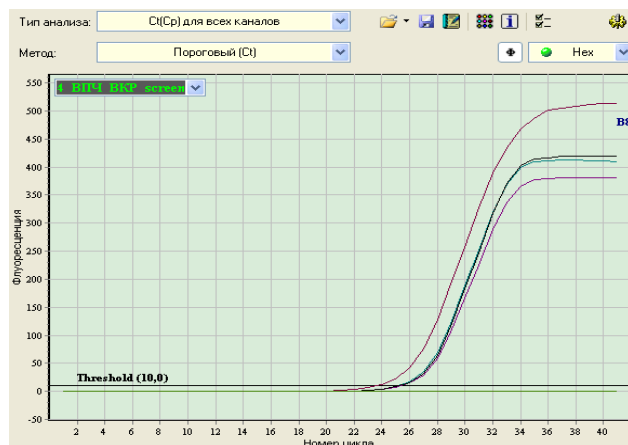
1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**, **Величина Threshold на участке линейного фитирования – 10 StD**.
5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога. Для этого внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** и, удерживая нажатой левую кнопку мыши, повысить уровень порога.
6. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены следующие результаты прохождения контрольных образцов:
 - в отрицательном контроле (В-) экстракции – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*;
 - в положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК ВПЧ 6, 11 типов и ДНК человека** – должно появиться значение *Ct* по всем каналам.
7. Нажать кнопку **Отчет**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат «*.xls Excel» либо «*.rtf MS Word», выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.
8. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с граничными значениями *Ct*, указанными во вкладыше к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие граничное значение порогового цикла, указанное во вкладыше, считаются положительными.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

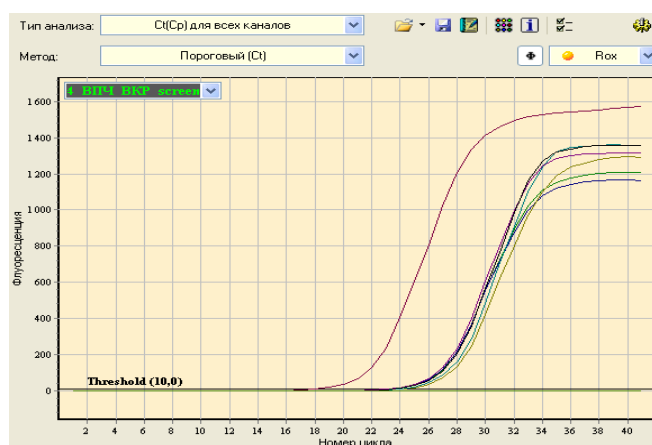
Данные по каналу Fam



Данные по каналу Hex



Данные по каналу Rox



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 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 осуществляется через крышку пробирки).

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 переворачивайте стрипы при устновке в прибор.

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.1). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл** для варианта **FRT-100 F**, **30 мкл** для варианта **FRT**.

ВНИМАНИЕ! Для всех программ амплификации для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**.

Таблица 1

Программа амплификации ДНК ВПЧ 6 и 11 типов

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	20 с	–	45
	60	1 мин	FAM, HEX, ROX	

Примечание – Данная программа амплификации является единой с программой амплификации для набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL».

ВНИМАНИЕ! Можно также использовать **универсальную программу**

амплификации и детекции «АмплиСенс-1» (см. табл. 2). С использованием универсальной программы амплификации «АмплиСенс-1» можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления ДНК возбудителей ИППП). С использованием программы амплификации «ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов» (для приборов планшетного типа: iCycler iQ5; «ДТ-96») можно одновременно проводить в одном приборе сочетание тестов для выявления ДНК ВПЧ ВКР и ДНК ВПЧ 6-11.

Аналитические характеристики данного набора реагентов при использовании универсальной программы амплификации «АмплиСенс-1» и «ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов» для наборов реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» не изменяются.

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-1» 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	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX	
	72	15 с	–	

- 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.
- 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.
- 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.

8. 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. Сохранить эксперимент.
9. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

По каналам FAM и HEX детектируется продукт амплификации ДНК, соответствующий специфической мишени, по каналу ROX детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца – участка β-глобинового гена). Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.

Вариант 1

Поочередно для каждого канала установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Вариант 2

Поочередно для каждого канала отметить галочкой **Log Scale**. Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и выше уровня шума.

Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...** возможно в появившемся окне задать название образцов и концентрации калибраторов.

Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены следующие результаты прохождения контрольных образцов:

– в отрицательном контроле (В–) экстракции – **ОКО** – не должно быть каких-либо

- значений C_t ;
- в отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ДНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений C_t ;
 - в положительном контроле (К+) ПЦР – **ПКО ДНК ВПЧ 6, 11 типов и ДНК человека** – должно появиться значение C_t по всем каналам.

Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с граничными значениями C_t , указанными во вкладыше к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения C_t по соответствующим каналам детекции, не превышающие граничное значение порогового цикла, указанное во вкладыше, считаются положительными.

Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1. Появление любого значения C_t по каналам FAM/Green, JOE/HEX/Yellow и/или ROX/Orange в таблице результатов для отрицательного контроля этапа ПЦР (К-) и/или для отрицательного контроля этапа экстракции (В-) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение C_t в таблице результатов для положительного контроля этапа ПЦР (К+) по каналам FAM/Green, JOE/HEX/Yellow и/или ROX/Orange отсутствует или превышает граничное значение, то необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК возбудителя.
3. Если для данного образца не определено значение порогового цикла C_t или оно превышает граничное значение по каналам FAM/Green и/или JOE/HEX/Yellow, приводимое для ВПЧ 6 и 11 генотипов, а по каналу ROX/Orange получено значение C_t превышающее граничное значение, приводимое для ВКО, то необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах, начиная с этапа экстракции. В случае получения воспроизводимого положительного значения C_t результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений результат считается сомнительным.