

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

  
В.Г. Акимкин

« 09 » 2018 г.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*), РНК вируса гепатита D (*HDV*), РНК вируса гепатита G (*HGV*), ДНК вируса гепатита В (*HBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс<sup>®</sup> *HCV-FL*», «АмплиСенс<sup>®</sup> *HGV-FL*»,  
«АмплиСенс<sup>®</sup> *HDV-FL*», «АмплиСенс<sup>®</sup> *HBV-FL*»**

**Формат FRT**

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



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

**IVD**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	3
ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) .	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ ROTOR-GENE 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) И ROTOR-GENE Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) .....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LINEGENE 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай).....	18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) .....	19
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА MX3000P (Stratagene, США) .....	22
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) .....	25
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (BIO-RAD Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) .....	28

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании наборов реагентов **формат FRT** для выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*) – «АмплиСенс® *HCV-FL*», РНК вируса гепатита D (*HDV*) – «АмплиСенс® *HDV-FL*», РНК вируса гепатита G (*HGV*) – «АмплиСенс® *HGV-FL*», ДНК вируса гепатита В (*HBV*) – «АмплиСенс® *HBV-FL*» в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000 (два и более каналов), Rotor-Gene 6000 (пятиканальный, шестиканальный) (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (пятиканальный, шестиканальный) (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)
- Mx3000P (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 <sup>1</sup>
Канал для флуорофора FAM	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
Канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ









**ВНИМАНИЕ!** В соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008 и ГОСТ 31340-2013 следующие реагенты подлежат маркировке, как содержащие опасные вещества:





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









Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м3	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Лизирующий раствор	<p>Опасно (Danger)</p>	<p>Опасно (Danger)</p>	Гуанидин хлорид	Нет данных			
			Тригон X-100	Нет данных			
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	<p>Опасно (Danger)</p>	<p>Опасно (Danger)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
			Гуанидин тиоцианат	Нет данных			
			Тригон X-100	Нет данных			
1-Тиоглицерол	Нет данных						

<sup>2</sup> Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>				
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м <sup>3</sup>	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны	
Раствор для лизиса	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Гуанидин тиоцианат	Нет данных				
			Тритон X-100	Нет данных				
			1-Тиоглицерол	Нет данных				
Раствор для отмывки 1	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Гуанидин тиоцианат	Нет данных				
			Тритон X-100	Нет данных				

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м <sup>3</sup>	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для отмывки 3	<p>H226: Воспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открыт ого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>   <p>редупреждение (Warning)</p>	<p>H226: Воспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открыт ого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>   <p>Предупреждение (Warning)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
Раствор для отмывки 4	<p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость или головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открыт ого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>   <p>Опасно (Danger)</p>	<p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость или головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открыт ого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>   <p>Опасно (Danger)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м <sup>3</sup>	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для отмывки 5	<p>H226: Воспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H302: Вредно при проглатывании. H312: Вредно при попадании на кожу. H314: При попадании на кожу и глаза вызывает химические ожоги. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H332: Вредно при вдыхании. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открыт ого огня. Не курить. P260: Не вдыхать газ/пары/пыль/аэрозоли. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>  <p>Опасно (Danger)</p>	<p>H226: Воспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H302: Вредно при проглатывании. H312: Вредно при попадании на кожу. H314: При попадании на кожу и глаза вызывает химические ожоги. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H332: Вредно при вдыхании. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открыт ого огня. Не курить. P260: Не вдыхать газ/пары/пыль/аэрозоли. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>  <p>Опасно (Danger)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
			Гуанидин тиоцианат	Нет данных			
Раствор для отмывки 6	<p>H226: Воспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открыт ого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>  <p>Предупреждение (Warning)</p>	<p>H226: Воспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открыт ого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>  <p>Предупреждение (Warning)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м <sup>3</sup>	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для отмывки 7	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Ацетон	800/200	Пары	Класс опасности 4	Не требуется
			Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
Раствор для преципитации	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

Примечание

ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV, ПЦР-смесь-1-FL HBV, ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HDV, ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HGV, ОКО	Концентрация опасного вещества (натрия азид) не более 0,125% - данные реагенты не классифицируются как опасные, не подлежат маркировке опасности и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности. При работе с данными реагентами необходимо соблюдать меры предосторожности, указанные в инструкции по применению	Натрия азид	Нет данных
--	---	-------------	------------

**ВНИМАНИЕ!** При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91.

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1; **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1; Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1; **REF** R-V2-50-F(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-1864-1; **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-1784-1; **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 12.11.18 / стр. 8 из 30



## ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)

**ВНИМАНИЕ!** При использовании автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) **не требуется** использование дополнительного комплекта реагентов «EM-плюс». Заявленные аналитические характеристики набора реагентов в случае экстракции РНК/ДНК при помощи автоматической станции с использованием реагентов NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) без комплекта реагентов «EM-плюс» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) сохраняются.

### Порядок работы

**Вариант 1.** Экстракция РНК/ДНК из образца объемом 100 мкл и лизис образца вне прибора.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции РНК/ДНК-плазма (*Plasma*), объем образца (*volume*) – **0,1 ml**, объем элюции (*Eluate*) – **55 mkl**, тип образца (*Type*) – **Lysed**, очередность экстракции РНК/ДНК в образцах (*priority*) – **normal**.
3. Создать новый протокол экстракции РНК/ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing – No, On-board Lysis Incubation – No**.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В ячейки картриджа, предназначенные для экстракции РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, раскатать по **450 мкл** смеси **буфера для лизиса NucliSens**.
6. В каждую ячейку добавить **100 мкл исследуемой плазмы** отдельным наконечником с фильтром, тщательно перемешать пипетированием.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ПК с буфером для лизиса NucliSens, добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл соответствующего ПКО** и тщательно перемешать пипетированием.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для

этого в ячейку, предназначенную для ОК с буфером для лизиса NucliSens, добавить **100 мкл ОКО** и тщательно перемешать пипетированием.

9. Оставить картридж с образцами на 10 мин при комнатной температуре для прохождения лизиса.

10. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и соответствующий ВКО одноразовыми наконечниками с фильтрами (см. табл. 1).

**ВНИМАНИЕ!** При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HDV*, РНК *HCV*, РНК *HGV*, ДНК *HBV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

Таблица 1

Количество образцов для экстракции РНК/ДНК	Количество магнитной силики NucliSens, мкл	Количество ВКО, мкл
1	10	10
8	90	90
16	170	170
24 (полная загрузка прибора)	250 (с запасом на 25 проб)	250

11. Добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **20 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и ВКО**. Каждую ячейку тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора отдельными наконечниками с фильтрами на 1000 мкл.

12. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК/ДНК с лизисом образцов вне прибора (*off-board*).

13. После окончания экстракции РНК/ДНК извлечь картридж из прибора и, **не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции РНК, провести реакцию ОТ-ПЦР/ПЦР**.

**Вариант 2.** Экстракция РНК/ДНК из образца объемом от 100 мкл до 1 мл с автоматическим лизисом образца в приборе.

1. Поставить флакон с буфером для лизиса NucliSens в прибор.

2. Для повышения чувствительности метода объем исследуемой плазмы может варьировать от 100 мкл до 1 мл. При этом лизис образца происходит в автоматическом режиме в приборе NucliSENS easyMAG, а объем буфера для лизиса NucliSens увеличивается до 2 мл. Для этого в каждую пробирку,

предназначенную для экстракции РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить от 100 мкл до 1 мл исследуемой плазмы отдельным наконечником с фильтром.

3. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ПК, добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл соответствующего ПКО**.
4. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ОК, добавить **100 мкл ОКО**.
5. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
6. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции РНК/ДНК-плазма (**Plasma**), объем образца (**volume**) – от **100 mkl** до **1 ml**, в зависимости от объема используемого клинического материала, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность экстракции РНК/ДНК в образцах (**priority**) – **normal**.
7. Создать новый протокол экстракции РНК/ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: **On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes**.
8. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
9. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК/ДНК с лизисом образцов в приборе (**on board**).
10. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State – Idle** (приблизительно 15 мин).
11. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и соответствующий ВКО одноразовыми наконечниками с фильтрами (см. табл. 1).

**ВНИМАНИЕ!** При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HDV*, РНК *HCV*, РНК *HGV*, ДНК *HBV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **20 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и ВКО**. Каждую

ячейку тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора с одноразовыми наконечниками с фильтрами на 1000 мкл.

13. Запустить на приборе программу продолжения экстракции РНК/ДНК.

14. После окончания экстракции РНК/ДНК извлечь картридж с образцами из прибора и, не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции РНК, провести реакцию ОТ-ПЦР/ПЦР.

**Набор реагентов при использовании автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG позволяет работать с объемами образцов от 0,1 мл до 1 мл.**

## **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/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/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 пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или объемом 0,1 мл.

### **Программирование амплификатора:**

1. Включить прибор.
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! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой из текущего эксперимента.** Если в один ротор загружаются пробирки с реагентами от разных наборов реагентов, то в первую лунку должна попасть пробирка с наибольшим количеством флуорофоров, например, при одновременной загрузке пробирок с тестами на генотипирование *HCV* и выявления *HDV* следует сначала поместить в ротор пробирки с реагентами для генотипирования *HCV*.

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probel/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)/надето 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 прибора Rotor-Gene 6000 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 следующие параметры (см. табл. 2):

Таблица 2

#### Программа амплификации «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	50	15 мин	–	1
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Примечание – Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

8. Нажать кнопку **OK/Да**.
9. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн..**

- осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-МЫХ**);
- калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
- установка калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

10. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.

11. Дать название эксперимента 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 и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип **None/Пусто**.

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

#### Анализ результатов реакции амплификации кДНК/ДНК специфической мишени (HCV, HDV, HGV или HBV) (канал 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(NTC)**) равным **10%**.

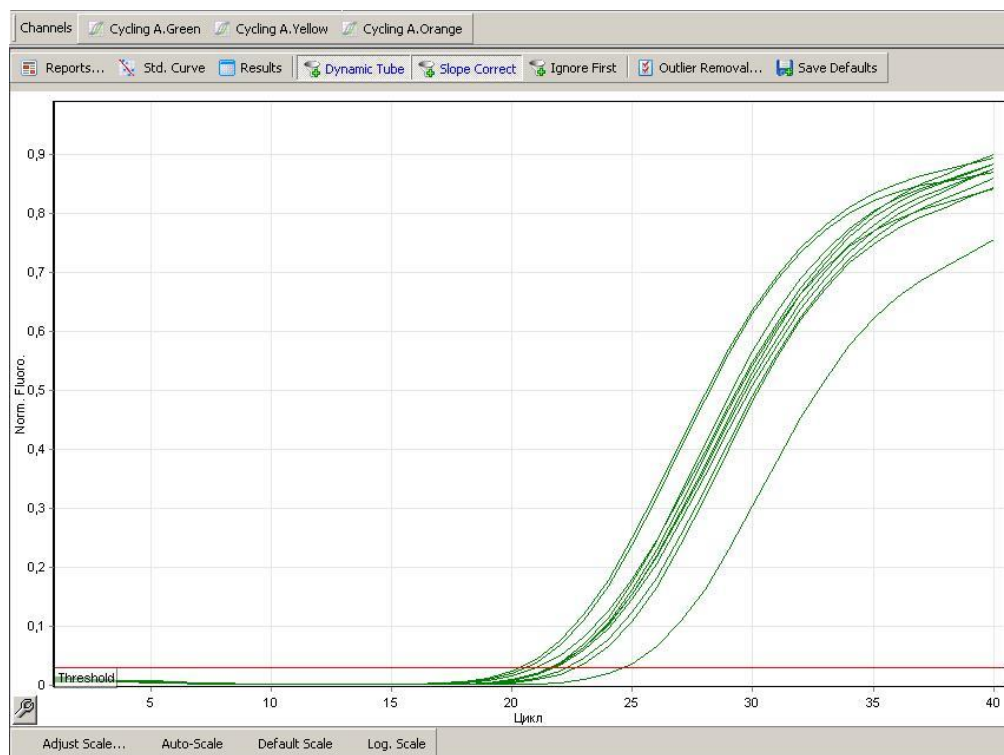
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

### **Анализ результатов амплификации ВКО (канал 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 установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона - ПФ(NTC)**) равным **10%**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct** для ВКО.

### **Пример полученных результатов**

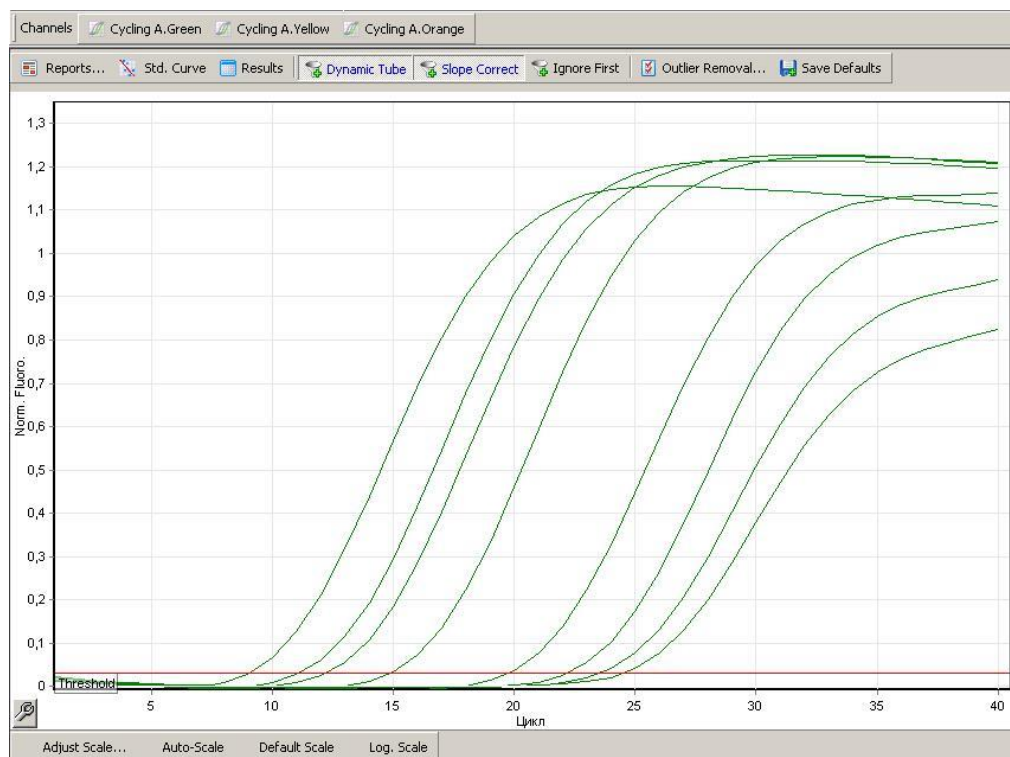
Данные по каналу FAM/Green – ВКО:



**Формат FRT Форма 2:** **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1; **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt);  
**REF** HK2-0302-1; **Форма 4:** **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1; **REF** R-V2-50-F(RG,iQ,Mx,Dt),  
**REF** H-1864-1; **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-1784-1; **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 /  
**VER** 12.11.18 / стр. 16 из 30



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



Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1; **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt);  
**REF** HK2-0302-1; Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1; **REF** R-V2-50-F(RG,iQ,Mx,Dt),  
**REF** H-1864-1; **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-1784-1; **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 /  
**VER** 12.11.18 / стр. 17 из 30

**ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай).**

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 крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через дно пробирки).

**Запуск прибора и анализ результатов проводить при помощи программного обеспечения FRT Manager.**

## 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 согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных пробирок для ПЦР объемом 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 iQ5.
3. Поместить пробирки или стрипы (часть плашки) или плашку 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. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать параметры амплификации (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Примечание – Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

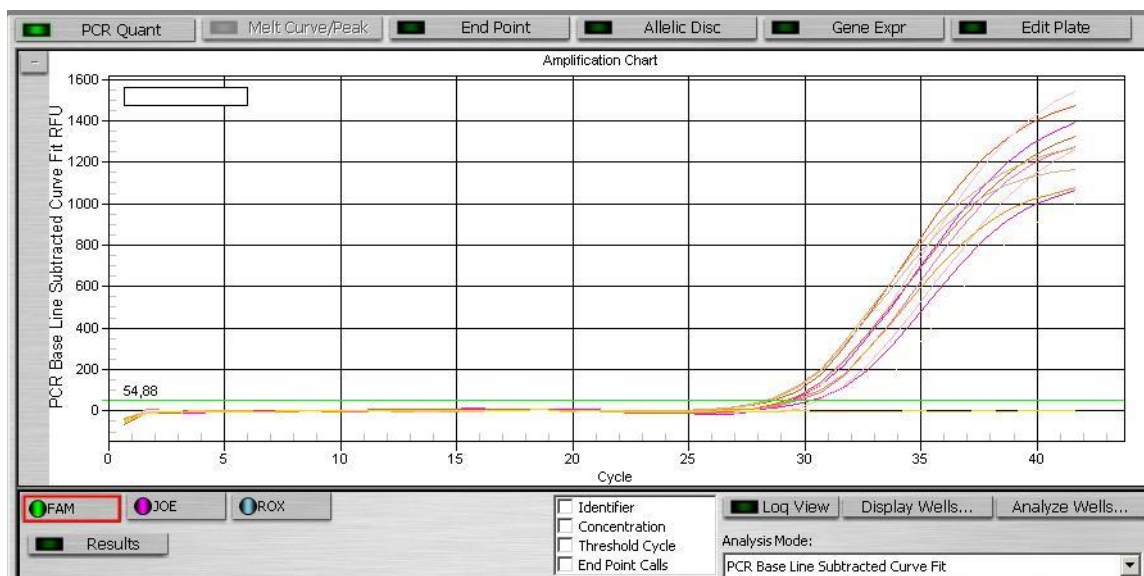
3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.
5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, для всех образцов задать измерение флуоресценции по каналам FAM и JOE/HEX.
6.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

### Анализ результатов

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

## Пример полученных результатов

Данные по каналу FAM – ВКО:



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



## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P (Stratagene, США)

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

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

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

3. Установить пробирки в прибор, закрыть фиксатор и дверцу прибора.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **FAM filter set** установить параметр FAM, напротив **HEX/JOE filter set – JOE**, напротив **ROX filter set – ROX**, напротив **Cy5 filter set – Cy5**.
5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы, и обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры FAM, JOE, ROX и Cy5.
6. В окне **Well Information** внести имя для каждого исследуемого образца.
7. На вкладке **Plate Setup** задать параметры съема флуоресценции с пробирок. Для этого выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки, и в выпадающем меню **Well type** выбрать **Unknown** и поле **Collect fluorescence data**. Отметить флуорофоры FAM, JOE, ROX и Cy5.
8. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации (см. табл. 4).

Таблица 4

Программа «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1; **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1; Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1; **REF** R-V2-50-F(RG,iQ,Mx,Dt), **REF** H-1864-1; **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-1784-1; **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 12.11.18 / стр. 22 из 30

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Примечание. Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

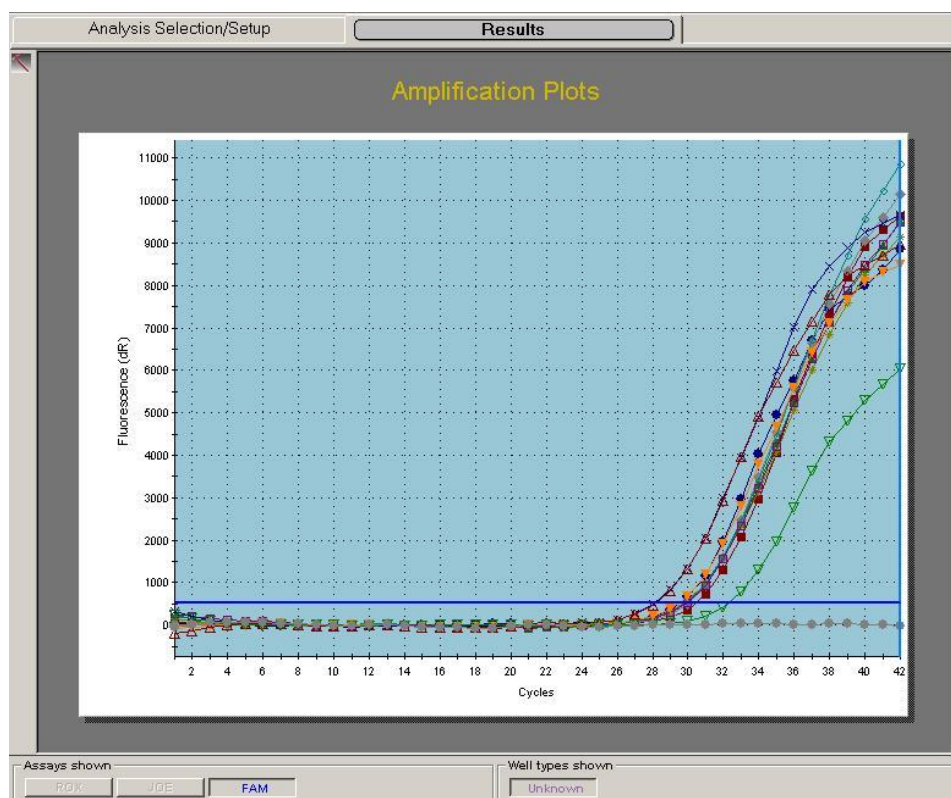
9. Запустить программу амплификации, нажав кнопку **Run**, затем **Start**, и ввести имя файла.

### **Анализ результатов**

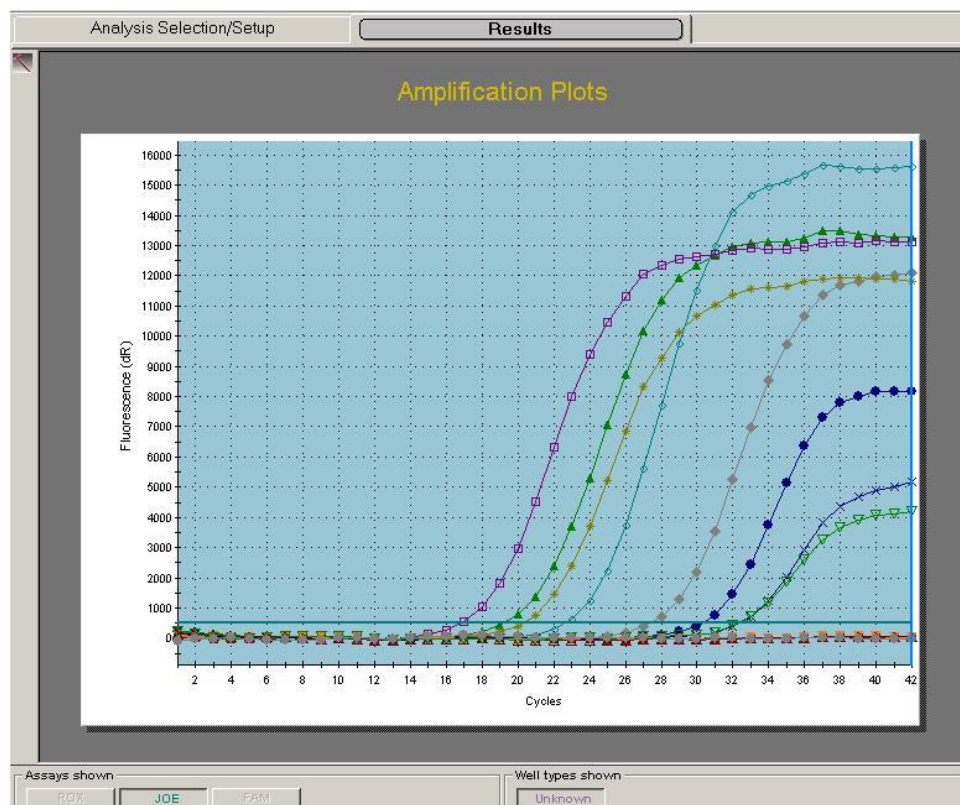
1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок).
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Для каждого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

## Пример полученных результатов

Данные по каналу FAM – ВКО:



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



Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1; **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt);  
**REF** HK2-0302-1; Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1; **REF** R-V2-50-F(RG,iQ,Mx,Dt),  
**REF** H-1864-1; **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-1784-1; **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 /  
**VER** 12.11.18 / стр. 24 из 30



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

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

1. Включить прибор и запустить программу RealTime\_PCR v.7.3. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – **AC-FL** 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** – 50 мкл
  - **Флуорофоры** – FAM - ВК; HEX - специфика.
  - Задать программу амплификации (см. табл. 5) и нажать **ОК**.

Таблица 5

### Программа амплификации «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	Fam, Hex, Rox, Cy5	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.). В случае, если в одном приборе

одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Примечание – Каналы *Rox* и *Su5* включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате *мультипрайм*, для которых используются эти каналы.

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

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

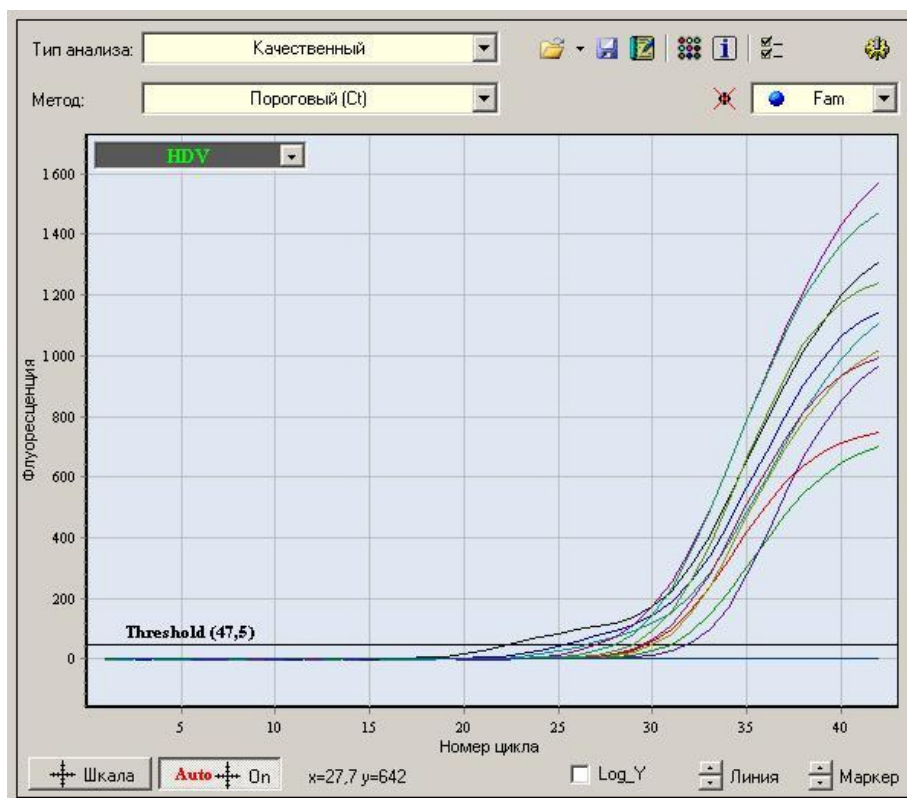
7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

### **Анализ результатов**

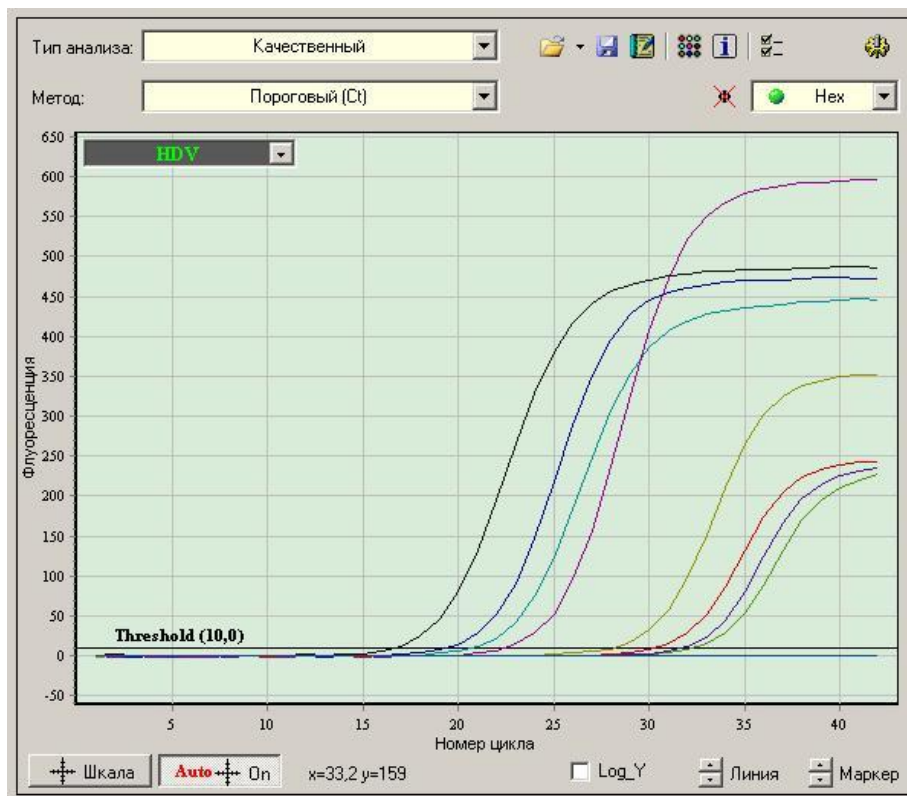
1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить **Критерий положительного результата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

## Пример полученных результатов

Данные по каналу Fam – ВКО:



Данные по каналу Hex – образцы, содержащие специфическую мишень:



Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1; **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt);  
**REF** HK2-0302-1; Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1; **REF** R-V2-50-F(RG,iQ,Mx,Dt),  
**REF** H-1864-1; **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-1784-1; **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 /  
**VER** 12.11.18 / стр. 27 из 30

## 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 прозрачных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция 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/плашку при установке 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**.

Таблица 6

### Программа амплификации «АмплиСенс-2» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для выявления *HBV*, генотипирования *HCV* и др.)

Примечание – Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

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

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. Сохранить эксперимент.

8. После окончания программы приступить к анализу результатов.

### Анализ результатов

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла  $C_t$  в соответствующей графе в таблице результатов).

1. Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии, используя один из способов:

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1; **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt);  
**REF** HK2-0302-1; Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1; **REF** R-V2-50-F(RG,iQ,Mx,Dt),  
**REF** H-1864-1; **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-1784-1; **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 /  
**VER** 12.11.18 / стр. 29 из 30

**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.

2. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, возможно в появившемся окне задать название образцов.
3. Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.