

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[®] HCV-FL», «АмплиСенс[®] HGV-FL»,
«АмплиСенс[®] HDV-FL», «АмплиСенс[®] HBV-FL»**

Формат FRT

АмплиСенс[®]



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) .	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ ROTOR-GENE 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) И ROTOR-GENE Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LINEGENE 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай).....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА MX3000P (Stratagene, США)	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	20
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (BIO-RAD Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	23

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 ¹
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

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

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

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 /

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 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
- установка калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

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%**.

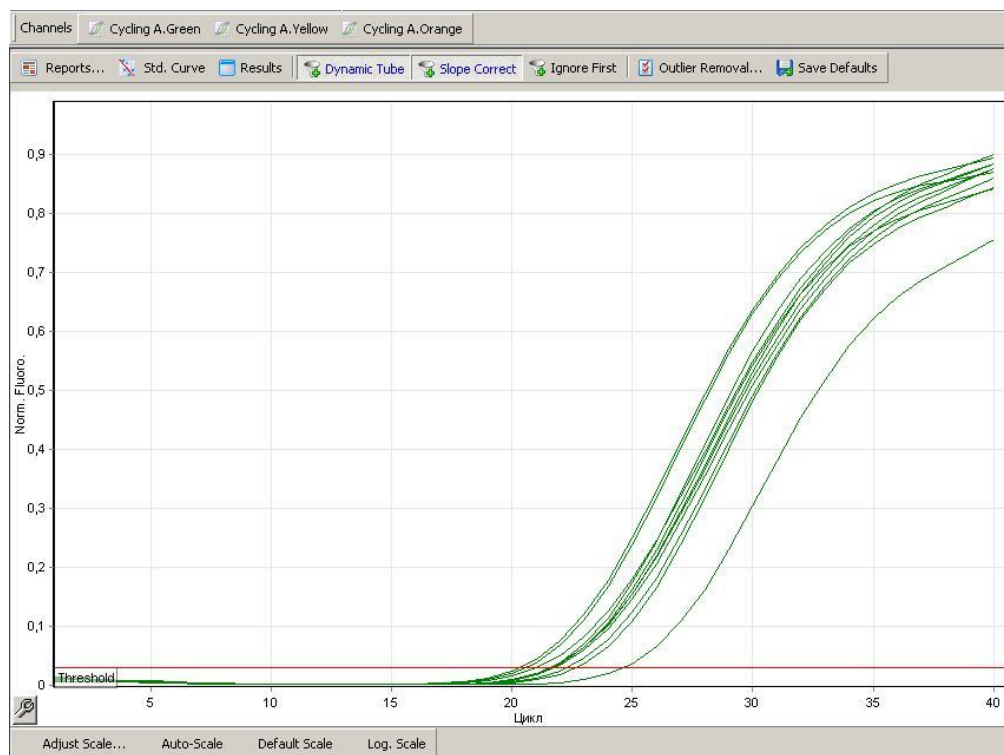
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

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.

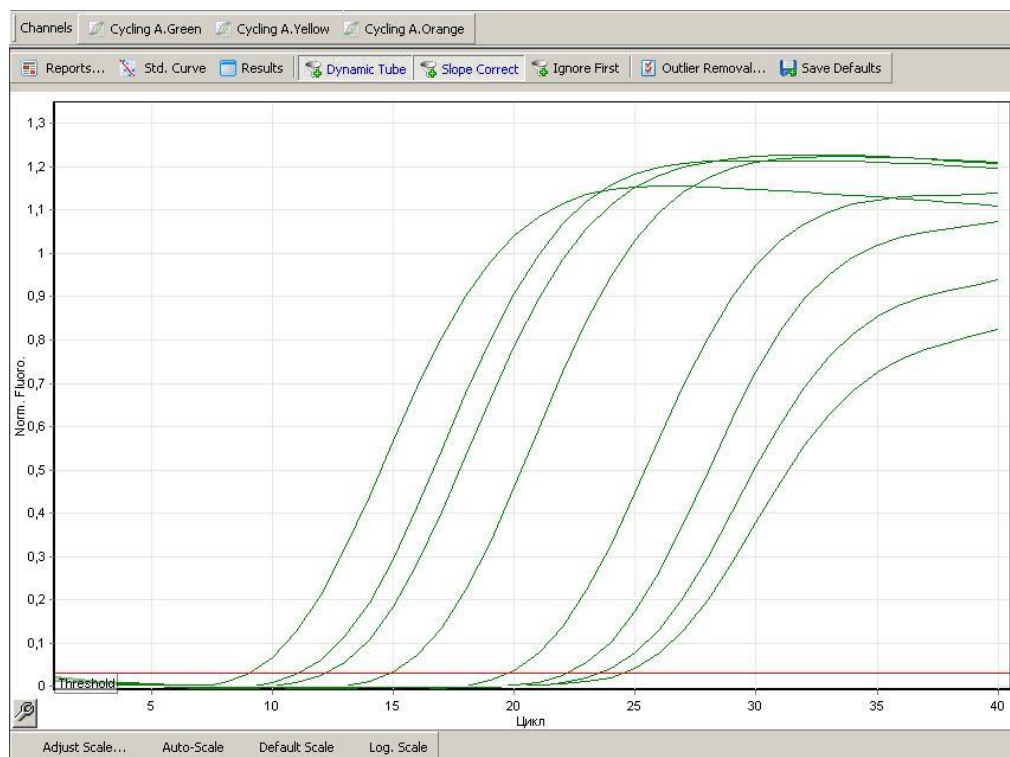
Пример полученных результатов

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 /

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 24.03.21 / стр. 12 из 25

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, Инс. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Инс. («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, °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, 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.

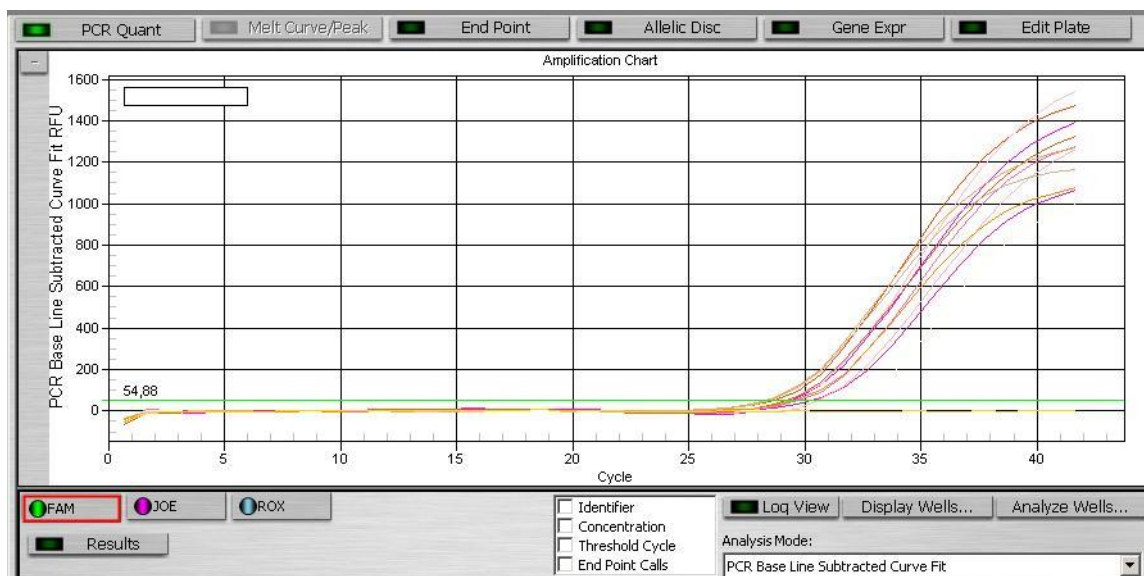
3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (***Plate Setup***). Задать схему расположения пробирок в планшете.
5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как ***Unknown***, для всех образцов задать измерение флуоресценции по каналам FAM и JOE/HEX.
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 Standards)** 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 /

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.

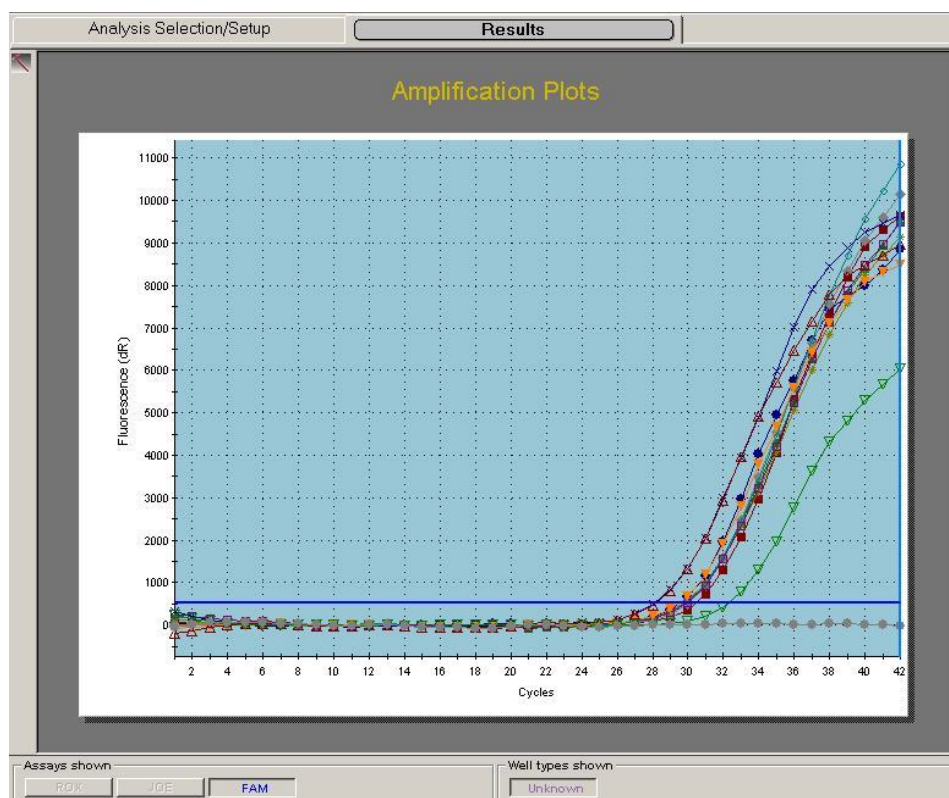
9. Запустить программу амплификации, нажав кнопку **Run**, затем **Start**, и ввести имя файла.

Анализ результатов

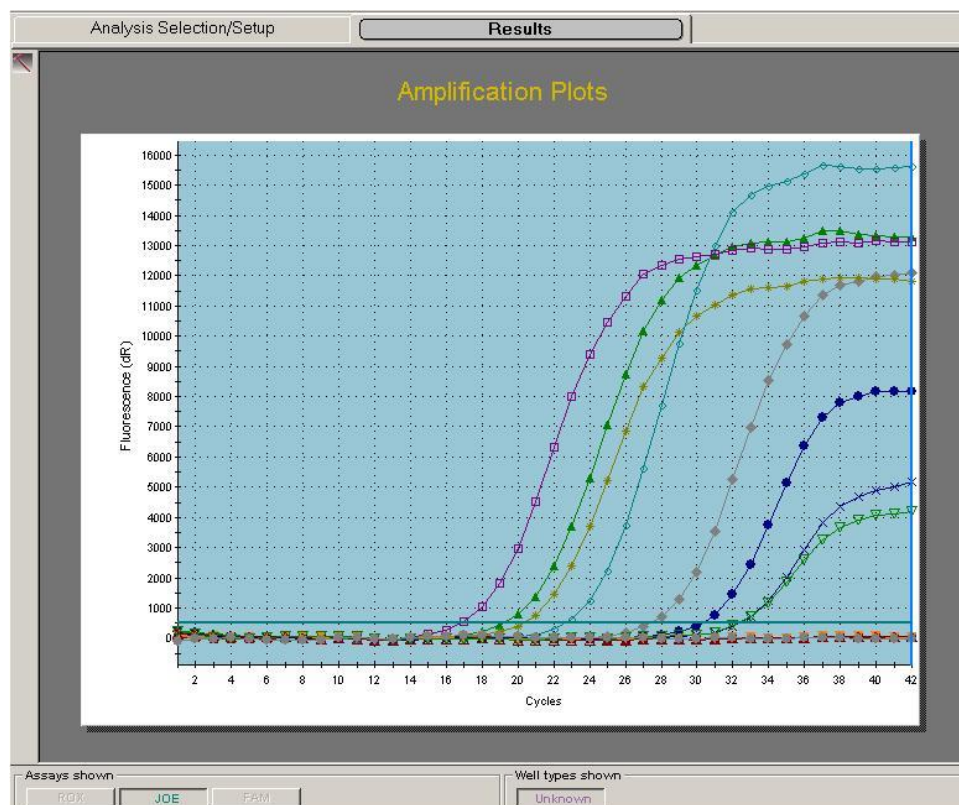
1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок).
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Для каждого 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 24.03.21 / стр. 19 из 25

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 *Sy5* 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.

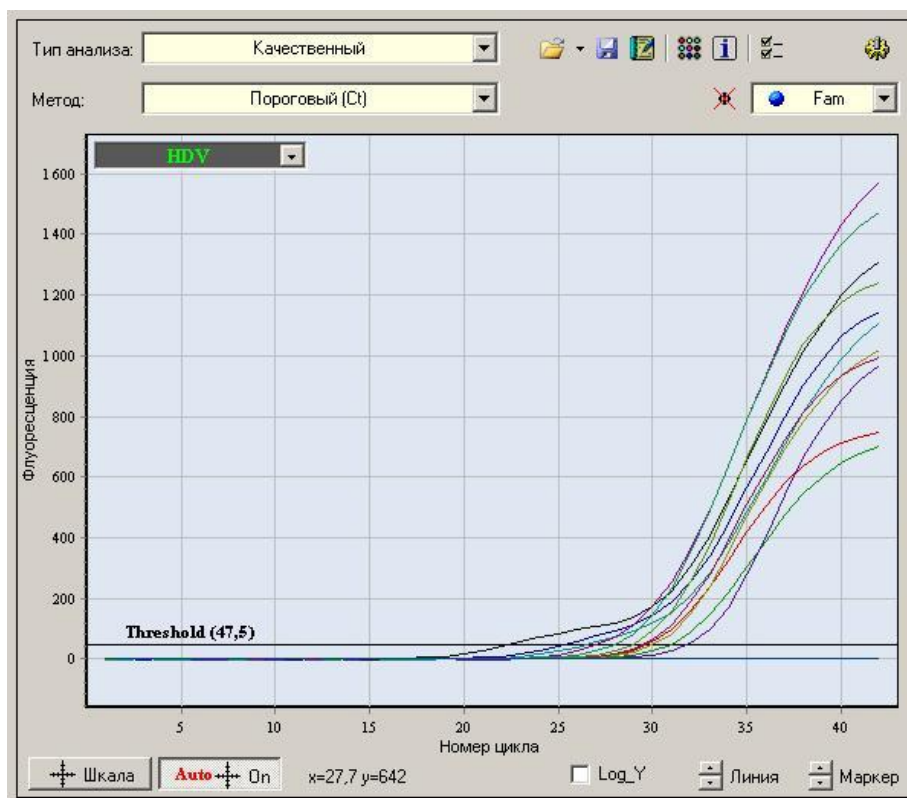
7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов

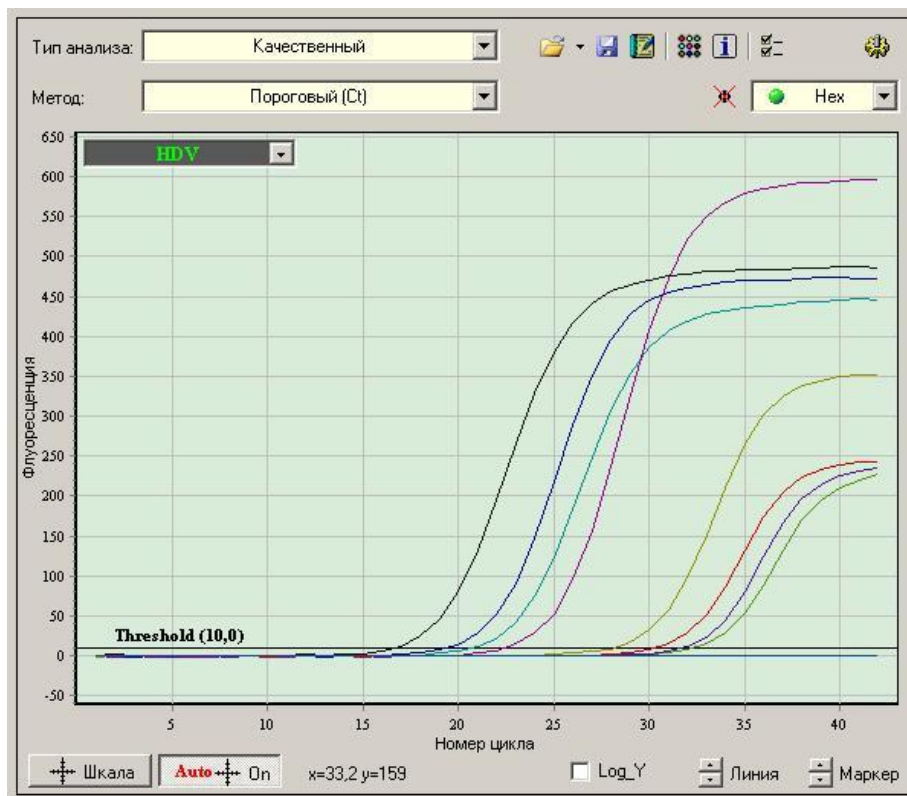
1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить **Критерий положительного результата 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 24.03.21 / стр. 22 из 25

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 24.03.21 / стр. 24 из 25

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.