

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса гепатита А (HAV)
в клиническом материале и объектах окружающей среды
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® HAV-FL»

Формат FRT

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ NucliSENS easyMAG	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).....	7
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США)	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P (Stratagene, США).....	17

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита А (HAV) в клиническом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HAV-FL» вариант FRT совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000 (четырёхканальный) (Corbett Research, Австралия),
- Rotor-Gene 6000 (пятиканальный, шестиканальный) (Corbett Research, Австралия),
- iCycler iQ (три и более каналов), iQ5 (Bio-Rad, США),
- Mx3000P (Stratagene, США).

а также совместно с автоматической станцией для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

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

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

ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ

NucliSENS easyMAG

Порядок работы

Вариант 1. Выделение РНК с лизисом образца вне прибора.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для выделения РНК (**Other**), объем образца (**Volume**) – **0,1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Lysed**, очередность выделения РНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол выделения РНК 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 таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для выделения РНК/ДНК в приборе **NucliSENS easyMAG**, (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-248-rec**. Добавить в пробирки по **450 мкл буфера для лизиса**.
6. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО**, внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку положительного контроля выделения (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО HAV-FL-rec**, тщательно перемешать пипетированием.
8. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.
9. Инкубировать пробирки в течение на 10 мин при комнатной температуре для прохождения лизиса.
10. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром по **20 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения РНК с лизисом образцов вне прибора (*off board*).

12. После окончания выделения РНК, извлечь пробирки из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК провести реакцию ОТ-ПЦР.**

Очищенные РНК можно хранить до 8 ч при температуре от 2 до 8 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

Вариант 2. Выделение РНК с лизисом образца в приборе.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для выделения РНК (**Other**), объем образца (**Volume**) – **0,1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность выделения РНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол выделения 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**.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для выделения РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-248-rec**.
6. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО**, внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку положительного контроля выделения (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО HAV-FL-rec**, тщательно перемешать пипетированием.
8. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.
9. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения РНК 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. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой**, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора и в каждую пробирку внести отдельным наконечником с фильтром (или с использованием многоканального дозатора с

одноразовыми наконечниками с фильтром на 200 мкл) по **20 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.

12. Закрывать крышку прибора и продолжить программу выделения РНК.

13. После окончания выделения РНК, извлечь пробирку из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК провести реакцию ОТ-ПЦР.**

Очищенные РНК можно хранить до 8 ч при температуре от 2 до 8°C, более длительно – при температуре не выше минус 68°C.

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

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

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

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 выявление *HAV* и генотипирование *HCV*, следует сначала поместить в ротор пробирки с реагентами для генотипирования *HCV*.

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

Программирование амплификатора:

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

5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать следующие параметры (см. табл. 1):

Таблица 1

Программа амплификации «АмплиСенс-3 RG»

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	50	30 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	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Универсальная программа амплификации и детекции «АмплиСенс-3 RG» позволяет одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для HCV и др.).

6. После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
7. Теста нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт. Уровня сигн..** В открывшемся окне в строке **Channel Settings/Установки канала** выбрать каналы **JOE/Yellow** и **FAM/Green**. Установить **Tube position/Позиция Пробирки 1**, **Min Reading/Миним. Сигнал 5**, **Max Reading/Максим. Сигнал 10**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
10. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К-», положительный – «К+/ВК+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, для положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, для отрицательного контроля ПЦР –

тип **NegativeControl/Отрицательный контроль**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». Анализируются результаты амплификации участка **кДНК HAV** и **кДНК ВКО**. Накопление продукта амплификации участка **кДНК HAV** детектируется по каналу **JOE/Yellow**, а накопление продукта амплификации **ВКО** – по каналу для детекции флуорофора **FAM/Green**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Анализ результатов реакции амплификации кДНК HAV (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 установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **10%**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации 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. Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **10%**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct** для ВКО.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты положительных и отрицательных контролей ПЦР и выделения РНК (см. табл. 2). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных во вкладыше к комплекту реагентов для приборов Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000.

Таблица 2

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение Ct по каналу	
		JOE/Yellow	FAM/Green
OK	Выделение РНК	отрицательный	≤ B1 (положительный)
ПК	Выделение РНК	≤ K1 (положительный)	≤ B1 (положительный)
К-	ПЦР	отрицательный	отрицательный
К+/ВК+	ПЦР	≤ K2 (положительный)	≤ B2 (положительный)

K1, K2, B1 и B2 - значения пороговых циклов, указанных во вкладыше к комплекту реагентов для приборов Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

1. **Образец считается положительным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/Yellow** для него определено значение порогового цикла **Ct**, не превышающее 35 циклов.
2. **Образец считается отрицательным**, если в таблице результатов по каналу

JOE/Yellow для него не определено значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу **FAM/Green** значение порогового цикла *Ct* не превышает значения порогового цикла B1, приводимого для ВКО во вкладыше к комплекту реагентов. для приборов Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000.

3. **Образец считается сомнительным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/Yellow** для него определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее 35 циклов. Образцы, для которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этому образцу – результат считается сомнительным.

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Если в положительном контроле экстракции РНК (ПК) отсутствует положительный сигнал. Возможная причина: ошибки при выделении РНК. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала.
2. Если в положительном контроле ПЦР (К+/ВК+) на канале **JOE/Yellow** отсутствует положительный сигнал. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР (например, неправильно выбранная программа амплификации). Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа ОТ-ПЦР.
2. Если для данного образца по каналу **JOE/Yellow** не определено значение порогового цикла *Ct*, и по каналу **FAM/Green** не определено значение порогового цикла *Ct* или оно превышает значение B1, приводимое для ВКО во вкладыше к комплекту реагентов для приборов Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере РНК или наличие ингибиторов ПЦР. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала.
3. Если в отрицательном контроле экстракции РНК (ОК) на канале **JOE/Yellow** и/или в отрицательном контроле ПЦР (К-) на любом из каналов детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб на этапе выделения РНК или на этапе ПЦР. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании приборов iQ5 и iCycler iQ, рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция через крышку пробирки).

Перед началом работы с прибором iQ5 необходимо убедиться, что он откалиброван для работы с объемом реакционной смеси 25 мкл. Калибровку прибора проводить для того вида пластика, в котором будет проводиться амплификация.

1. Включить прибор, запустить программу iQ5.

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

2. 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/плашку при установке в прибор.

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать параметры амплификации (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации «АмплиСенс-3 iQ»

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 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/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Универсальная программа амплификации и детекции «АмплиСенс-3 iQ» позволяет одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HCV* и др.).

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**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-». Для всех образцов задать измерение флуоресценции по двум каналам JOE/HEX/JOE-530 и FAM/FAM-490.
6. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
7. Для запуска прибора нажать кнопку **Run** (для прибора iQ5) или **Run with selected protocol** (для прибора iCycler iQ). В открывшемся окне указать объем образца **Sample Volume 25 мкл**. Для прибора iCycler iQ использовать способ определения фактора лунок по экспериментальной планшете **Experimental Plate**. Для прибора iQ5 допускается использование как режима с измерением факторов лунок по экспериментальным пробиркам, так и фиксированных факторов лунок (рекомендуется).
8. Нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения iQ для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По одному из каналов – **FAM/FAM-490** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **кДНК ВКО**, а по другому – **JOE/HEX/JOE-530** – **кДНК HAV (ПКО)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Обработка данных

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого в модуле *Workshop* нажать **Data file** и выбрать файл данных. Перейти в режим **Data Analysis**.
2. Просмотреть данные отдельно по каждому каналу.

Анализ результатов амплификации ВКО (по каналу FAM/FAM-490):

Нажать кнопку **Log View**. Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер (см. Рис.1).

Анализ результатов амплификации РНК HAV (по каналу JOE/HEX/JOE-530):

Нажать кнопку **Log View**. Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер (см. Рис.1).

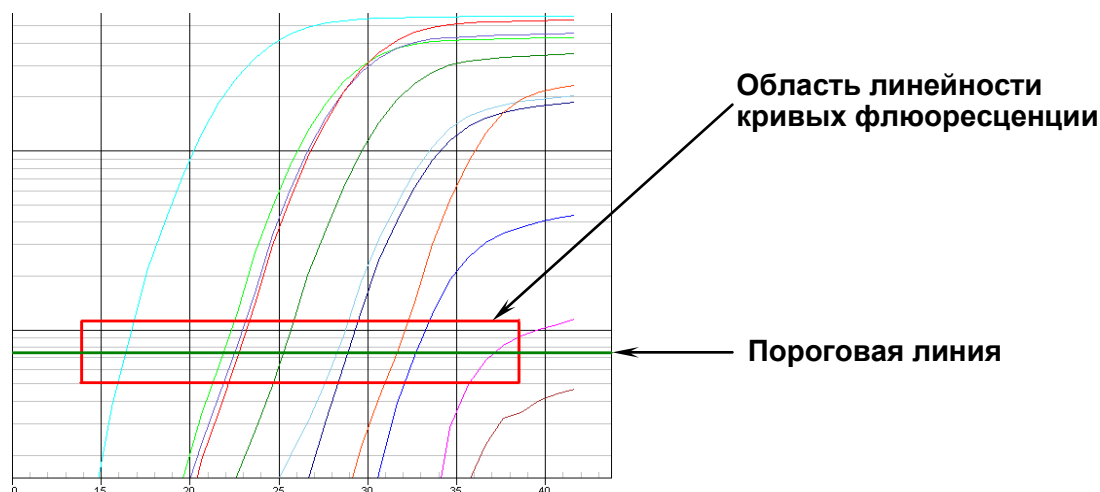


Рисунок 1. Установление уровня пороговой линии «вручную».

- Для анализа результатов нажать кнопку **«PCR Quant»** (для прибора iCycler iQ) или кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (для прибора iQ5).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты положительных и отрицательных контролей ПЦР и выделения РНК (см. табл. 4). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных во вкладыше к комплекту реагентов для приборов iCycler iQ и iQ5.

Таблица 4

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение C_t по каналу	
		JOE/HEX/JOE-530	FAM/FAM-490
OK	Выделение РНК	отрицательный	$\leq B1$ (положительный)
ПК	Выделение РНК	$\leq K1$ (положительный)	$\leq B1$ (положительный)
К-	ПЦР	отрицательный	отрицательный
К+/ВК+	ПЦР	$\leq K2$ (положительный)	$\leq B2$ (положительный)

K1, K2, B1 и B2 - значения пороговых циклов, указанных во вкладыше к комплекту реагентов для приборов iCycler iQ и iQ5.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

1. **Образец считается положительным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/HEX/JOE-530** для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее 35 циклов.
2. **Образец считается отрицательным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/HEX/JOE-530** для него не определено значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу **FAM/FAM-490** значение порогового цикла *Ct* не превышает значения порогового цикла B1, приводимого для ВКО во вкладыше к комплекту реагентов для приборов iCycler iQ и iQ5.
3. **Образец считается сомнительным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/HEX/JOE-530** для него определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее 35 циклов. Образцы, для которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этому образцу – результат считается сомнительным.

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Если в положительном контроле экстракции РНК (ПК) отсутствует положительный сигнал. Возможная причина: ошибки при выделении РНК. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала.
2. Если в положительном контроле ПЦР (К+/ВК+) на канале **JOE/HEX/JOE-530** отсутствует положительный сигнал. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР (например, неправильно выбранная программа амплификации). Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа ОТ-ПЦР.
2. Если для данного образца по каналу **JOE/HEX/JOE-530** не определено значение порогового цикла *Ct*, и по каналу **FAM/FAM-490** не определено значение порогового цикла *Ct* или оно превышает значение B1, приводимое для ВКО во вкладыше к комплекту реагентов для приборов iCycler iQ и iQ5. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к

потере РНК или наличие ингибиторов ПЦР. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала.

3. Если в отрицательном контроле экстракции РНК (ОК) на канале **JOE/HEX/JOE-530** и/или в отрицательном контроле ПЦР (К-) на любом из каналов детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб на этапе выделения РНК или на этапе ПЦР. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора Mx3000P рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция через крышку пробирки).

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. Поместить пробирки или стрипы (часть плашки) или плашку в реакционный модуль амплификатора, закрыть фиксатор, дверцу прибора 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/плашку при установке в прибор.

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя 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.
5. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить флажок **Turn lamp on for warm-up**.
6. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью).
 - Обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** установить два флажка **FAM** и **JOE**. Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно **Well Information**). *Внести подписи образцов так же можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню **Plate Setup**.*
7. На вкладке **Plate Setup** задать параметры съема флуоресценции с пробирок. Для этого выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки

(удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью); в выпадающем меню **Well type** выбрать тип **Unknown** и поле **Collect fluorescence data**, установить два флажка **FAM** и **JOE**; далее дважды щелкая по каждой ячейке, внести подписи пробирок (Окно **Well Information**), положительный контроль обозначить как «+», отрицательный - как «-».

8. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации (см. табл. 5).

Таблица 5

Программа амплификации «АмплиСенс-3 Мх»

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 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	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Универсальная программа амплификации и детекции «АмплиСенс-3 Мх» позволяет одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HCV* и др.).

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

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения Mx3000P для проведения ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По одному из каналов – **FAM** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **кДНК ВКО**, а по другому – **JOE/HEX** – **кДНК HAV** (ПКО).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла **Ct** в соответствующей графе в таблице результатов.

Обработка данных

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

2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедится, что все исследуемые образцы активны (ячейки соответствующие образцам должны иметь другой оттенок). В противном случае выбрать все исследуемые образцы, удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Убедиться, что два флуоресцентных канала активны (кнопки **JOE**, **FAM** нажаты в поле **Dyes Shown** внизу окна программы).
5. В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив двух флуоресцентных каналов: JOE/HEX, FAM. Проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные² кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысьте уровень порога.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ

Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты положительных и отрицательных контролей ПЦР и выделения РНК (см. табл. 6). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных во вкладке к комплекту реагентов для прибора Mx3000P.

Таблица 6

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение Ct по каналу	
		JOE/HEX	FAM
ОК	Выделение РНК	отрицательный	≤ B1 (положительный)
ПК	Выделение РНК	≤ K1 (положительный)	≤ B1 (положительный)
К-	ПЦР	отрицательный	отрицательный
К+/ВК+	ПЦР	≤ K2 (положительный)	≤ B2 (положительный)

K1, **K2**, **B1** и **B2** - значения пороговых циклов, указанных во вкладке к комплекту реагентов для прибора Mx3000P.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

1. **Образец считается положительным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/HEX** для него определено значение порогового цикла **Ct**, не превышающее

² 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**.

35 циклов.

2. **Образец считается отрицательным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/HEX** для него не определено значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу **FAM** значение порогового цикла C_t не превышает значения порогового цикла B_1 , приводимого для ВКО во вкладыше к комплекту реагентов для прибора Mx3000P.
3. **Образец считается сомнительным**, если в таблице результатов по каналу **JOE/HEX** для него определено значение порогового цикла C_t , превышающее 35 циклов. Образцы, для которых получен подобный результат, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этому образцу – результат считается сомнительным.

Результаты анализа не подлежат интерпретации в следующих случаях:

1. Если в положительном контроле экстракции РНК (ПК) отсутствует положительный сигнал. Возможная причина: ошибки при выделении РНК. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала.
2. Если в положительном контроле ПЦР (К+/ВК+) на канале **JOE/HEX** отсутствует положительный сигнал. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР (например, неправильно выбранная программа амплификации). Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа ОТ-ПЦР.
2. Если для данного образца по каналу **JOE/HEX** не определено значение порогового цикла C_t , и по каналу **FAM** не определено значение порогового цикла C_t или оно превышает значение B_1 , приводимое для ВКО во вкладыше к комплекту реагентов для прибора Mx3000P. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере РНК или наличие ингибиторов ПЦР. Необходимо провести анализ повторно, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала.
3. Если в отрицательном контроле экстракции РНК (ОК) на канале **JOE/HEX** и/или в отрицательном контроле ПЦР (К-) на любом из каналов детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб на этапе выделения РНК или на этапе ПЦР. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ, а

также предпринять меры по выявлению источника контаминации.