

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения

ДНК *Parvovirus* B19 в клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *Parvovirus* B19-FL»

Формат FRT

АмплиСенс[®]



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США)	16
РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНК <i>Parvovirus</i> B19	20
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	20

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Parvovirus* B19 в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *Parvovirus* B19-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- iQ iCycler, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США).

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.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

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

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 плоской крышкой (например, Axugen («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

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

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

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 Rotor/72-луночный ротор**), и отметить, что вы не используете пробирки с круглыми крышками/закреплено фиксирующее кольцо. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. 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 амплификации:

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
1 Cycling/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
2 Cycling/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа позволяет проводить исследования на нескольких тест-системах «АмплиСенс» в одном запуске прибора по единой программе (например, совместно с урогенитальными тест-системами).

Примечание – Каналы **ROX/Orange**, **Cy5/Red**, **Cy5.5/Crimson** включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

6. После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.:**
 - а) осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - б) калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);

- в) для установки калибровки всех каналов нужно указать в графе **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 клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К–», положительный как «К+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC**. Для калибраторов указать тип **Standard/Стандарт** и указать их концентрации в столбце **Given Conc**. Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше к набору реагентов. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *Parvovirus B19*.

Анализ результатов амплификации ДНК *Parvovirus B19* (канал JOE/Yellow):

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A.**

Yellow, Show/Показать.

3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct** и значения концентрации ДНК (**Calc Conc (copies/reaction)**).

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM/Green):

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) должны появиться значения **Ct** и значения концентрации ДНК (**Calc Conc (copies/reaction)**).

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в

соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) (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 в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

ВНИМАНИЕ! Следить за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (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:

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
1 Cycling/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
2 Cycling/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа позволяет проводить исследования на нескольких тест-системах «АмплиСенс» в одном запуске прибора по единой программе (например, совместно с урогенитальными тест-системами).

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

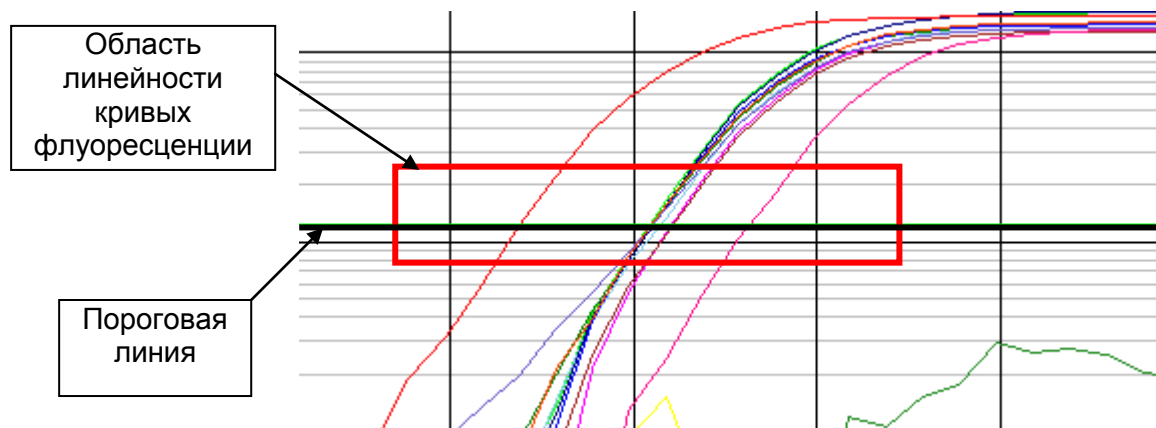
3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.
5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-». Калибраторы по каналу **HEX** и **FAM** задать как **Standard** и указать концентрацию из вкладыша, прилагаемого к набору реагентов. При задании калибраторов кнопка **Whole Plate Loading** должна быть не активирована. Для всех образцов и калибраторов задать измерение флуоресценции по двум каналам **HEX-530** и **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 – 25 мкл. Для прибора iCycler iQ использовать способ определения фактора лунок по экспериментальной плашке **Experimental Plate**. Для прибора iQ5 допускается использование как режима с измерением факторов лунок по экспериментальным пробиркам, так и фиксированных факторов лунок (рекомендуется). Нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора iCycler iQ5. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (**Ct**) в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями **Ct** калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *Parvovirus B19*.

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. Просматривать данные отдельно по каждому каналу.
3. 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, 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 (см. рис.).



В таблице результатов (окно **Quant. Results**) появятся значения *Ct* и значения концентраций (**copies/reaction**) для анализируемого канала.

4. Для анализа результатов нажать кнопку **PCR Quant** (iQ iCycler) или активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (iQ5).

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (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 крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
2. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	—	1
1 Cycling/ Циклирование 1	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
2 Cycling/ Циклирование 2	95	5 с	—	40
	60	30 с	FAM, HEX	
	72	15 с	—	

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. ниже). Нажать **OK**.

1	95,0 C for 15:00
2	95,0 C for 0:05
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3	60,0 C for 0:20
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	72,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5	GOTO 2 , 4 more times
6	95,0 C for 0:05
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
7	60,0 C for 0:30
	+ Plate Read
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
8	72,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
9	GOTO 6 , 39 more times
	END

ВНИМАНИЕ! Данная программа позволяет проводить исследования на нескольких тест-системах «АмплиСенс» в одном запуске прибора по единой программе (например, совместно с урогенитальными тест-системами).

Примечание – Каналы **ROX**, **Cy5**, **Quasar 705** включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

3. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

4. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM**, **HEX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов, кроме ДНК-калибраторов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

Для ДНК-калибраторов **K1** и **K2** для всех каналов обозначить **Sample type** – **Standard** и указать их концентрацию в поле **Concentration** в соответствии с вкладышем к набору реагентов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

5. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

6. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

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 пробирки (стрипы) при установке в прибор.

7. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Использование готового шаблона для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;
- в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Plate** выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями C_t калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *Parvovirus B19*.

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно

поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы Bio-Rad CFX Manager

Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид в линейной шкале)	Установить линию порога на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контроля в последнем цикле амплификации (в логарифмической шкале)
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Повторная амплификация для данного образца

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

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

1. Включить прибор, запустить программу Stratagene Mx3000P.
2. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить 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 крышку.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **HEX/JOE filter set** установить параметр **JOE**, напротив пункта **FAM filter set** установить параметр **FAM**.

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

5. Закрывать фиксатор и дверцу прибора.
6. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить флажок **Turn lamp on for warm-up**.
7. 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 также можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню **Plate Setup**.

8. На вкладке **Plate Setup** задать параметры съема флуоресценции с пробирок. Для этого:

- выбрать 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, JOE**; далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести подписи пробирок (окно **Well Information**), положительный контроль обозначить как «+», отрицательный как «-».
9. Калибраторы по каналам **HEX** и **FAM** задать как **Standard** и указать концентрацию из вкладыша, прилагаемого к набору реагентов.
10. Перейти на вкладку **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации. Для этого использовать один из следующих способов:

Использование шаблонного файла для задания программы амплификации (рекомендуется)

Нажать кнопку **Import...** справа от изображения профиля термоциклирования. Перейти в папку, содержащую предшествующий экспериментальный файл, и открыть его. В окне **Thermal Profile** появится необходимый профиль термоциклирования.

Самостоятельное программирование

1. После задания всех необходимых значений и параметров, снова выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки. Перейти в меню **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации:

Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	-	1
1 Cycling/ Циклирование 1	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
2 Cycling/ Циклирование 2	95	5 с	-	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	-	

ВНИМАНИЕ! Данная программа позволяет проводить исследования на нескольких тест-системах «АмплиСенс» в одном запуске прибора по единой программе (например, совместно с урогенитальными тест-системами).

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

2. Для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию **All points** для параметра **Data**

collection marker by dragging и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.

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

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора Mx3000P/Mx3005P. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК *Parvovirus B19*.

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
3. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок). В противном случае выбрать все исследуемые образцы, удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.
4. Перейти на вкладку **Results**.
5. Убедиться, что два флуоресцентных канала активны (кнопки **HEX**, **FAM** нажаты в поле **Dyes Shown** внизу окна программы).
6. 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 сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысить уровень порога. По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, необходимо дважды щелкнуть левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне **Graph properties** для оси Y (Y axis) поставить галочку в поле **Scale** напротив пункта **Log**.
7. В таблице результатов появятся значения *Ct* и значения концентраций

(copies/reaction).

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНК *Parvovirus B19*

Расчет концентрации ДНК *Parvovirus B19* в исследуемых и контрольных образцах проводится по формуле:

$$\frac{\text{Количество ДНК } Parvovirus B19 \text{ (МЕ/реакцию)}}{\text{Количество ДНК ВКО STI-87 (копий/реакцию)}} \times \text{коэффициент А} \times \text{коэффициент В (копий/мл)} = \text{МЕ/мл}$$

$$\text{Коэффициент А} = \frac{100}{\text{объем экстракции, мкл}}$$

ВНИМАНИЕ! Коэффициент В (число копий ВКО/мл) указывается во вкладыше к данной серии «ПЦР-комплекта» и не может быть использован для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1. Появление любого значения *Ct* по каналам для флуорофоров JOE/Yellow/HEX (*Parvovirus B19*) и/или FAM/Green (ВКО STI-87) в таблице результатов для отрицательного контроля ПЦР (К-) и для отрицательного контроля экстракции (В-) на канале для флуорофора JOE/Yellow/HEX свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение *Ct* в таблице результатов для положительного контроля ПЦР ПКО ДНК *Parvovirus B19* и STI отсутствует – результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов, начиная с этапа ПЦР.
3. Значения МЕ на реакцию в калибраторах более чем на 30 % отличаются от заданных – необходимо проверить порядок размещения пробирок в приборе.
4. Коэффициент корреляции R в окне **Standard Curve** менее 0,9 – сбой калибровки. Необходимо проверить правильность задания калибраторов и исправить неточности. Если это не помогает – повторить ПЦР для всех проб и калибраторов.