

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса Западного Нила
в биологическом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® WNV-FL»

Формат FRT

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США).....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P (Stratagene, США)	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила (WNV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® WNV-FL» совместно с приборами для ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- Mx3000P (Stratagene, США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

Соответствие мишеней и каналов детекции

ПЦР-смесь-1	Детекция по каналу	
	FAM/Green	JOE/Yellow
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT WNV	ВКО	WNV

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) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), 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/Q/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/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, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки или стрипы в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку.

ВНИМАНИЕ! 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. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
2. Во вкладке выбрать шаблон **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл** для редактирования и нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл.** Установить галочку напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска.** Нажать кнопку **Next/Далее.**
5. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

Программа амплификации для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	50	30 мин	–	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	56	25 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	56	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

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.** В открывшемся окне:
 - а) для оптимизации измерения сигнала по выбранным каналам установить калибровку от **5FI** до **10FI** для всех каналов FAM/Green, JOE/Yellow.
Для этого нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-ных**, в открывшемся для первого канала окне (**Auto Gain Optimisation Channel Settings/Auto Gain Calibration Channel Settings/Установку Авто-оптимизации уровня сигнала**) указать в строке **Target Sample Range/Нужный диапазон стартового сигнала** значения минимального и максимального сигнала, нажать кнопку **OK**. Автоматически откроется окно для следующего канала. Проверить выбранные для всех каналов значения можно в графах **Min Reading/Миним. Сигнал, Max Reading/Максим. Сигнал.**
 - б) осуществлять калибрование по выбранным каналам перед первым измерением (отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть.**

8. Нажать кнопку **Next/Далее**. Для сохранения запрограммированного шаблона, необходимо, нажав кнопку **Save Template/Сохр.шаблон**, задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе амплификации. Сохранить файл в предлагаемую папку: **Templates\Quick Start Templates**; закрыть окно **New Run Wizard/Мастер Нового Теста**. После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне **New Run/Новый тест**.

Использование готового шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. В открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**, затем в списке шаблонов выбрать шаблон, запрограммированный согласно описанию в разделе **Создание шаблона**.
2. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes/Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
3. В открывшемся окне, проверить, что указан объем реакционной смеси **Reaction volume/Объем реакции**, равный **25 мкл**, и напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска** установлена галочка, активирующая эту опцию. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В следующем окне можно проверить правильность программ амплификации и детекции и условий автооптимизации уровня сигнала, заданных в шаблоне. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. При этом ротор с образцами должен быть уже закреплен и крышка прибора закрыта. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
5. 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+». Напротив всех исследуемых биологических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **Negative control/Отрицательный контроль**.

Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**. Нажать кнопку **Finish/OK/Закончить**.

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

Примечание – Для редактирования таблицы образцов до старта нужно, чтобы предварительно в меню *File/Файл* подменю *User preferences/Предпочтения* был выбран пункт *Edit Samples Before Run Started/Редактировать образцы перед стартом теста*.

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.

Анализ результатов амплификации по каналу 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. Выбрать линейный тип шкалы (*Linear scale/Линейная шкала*).
4. В меню основного окна (*Quantitation analysis/Количественный анализ*) должны быть активированы кнопки *Dynamic tube/Динамич.фон, Slope Correct/Коррек. 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 **5 %**.
7. В меню *Eliminate cycles before/Исключить циклы до* (в правой части окна) выставить – **5**.
8. В таблице результатов (окно *Quant. Results/Количественные Результаты*) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов реакции амплификации по каналу JOE/Yellow

Провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Канал	<i>Threshold/ Порог</i>	<i>Dynamic tube/ Динамич.фон</i>	<i>Slope Correct/ Коррект. уклона</i>	<i>More Settings/Outlier Removal/ Устранение выбросов</i>	<i>Eliminate cycles before:/ Исключить циклы до:</i>
FAM/Green	0,03	включена	включена	5 %	5
JOE/Yellow	0,03	включена	включена	5 %	5

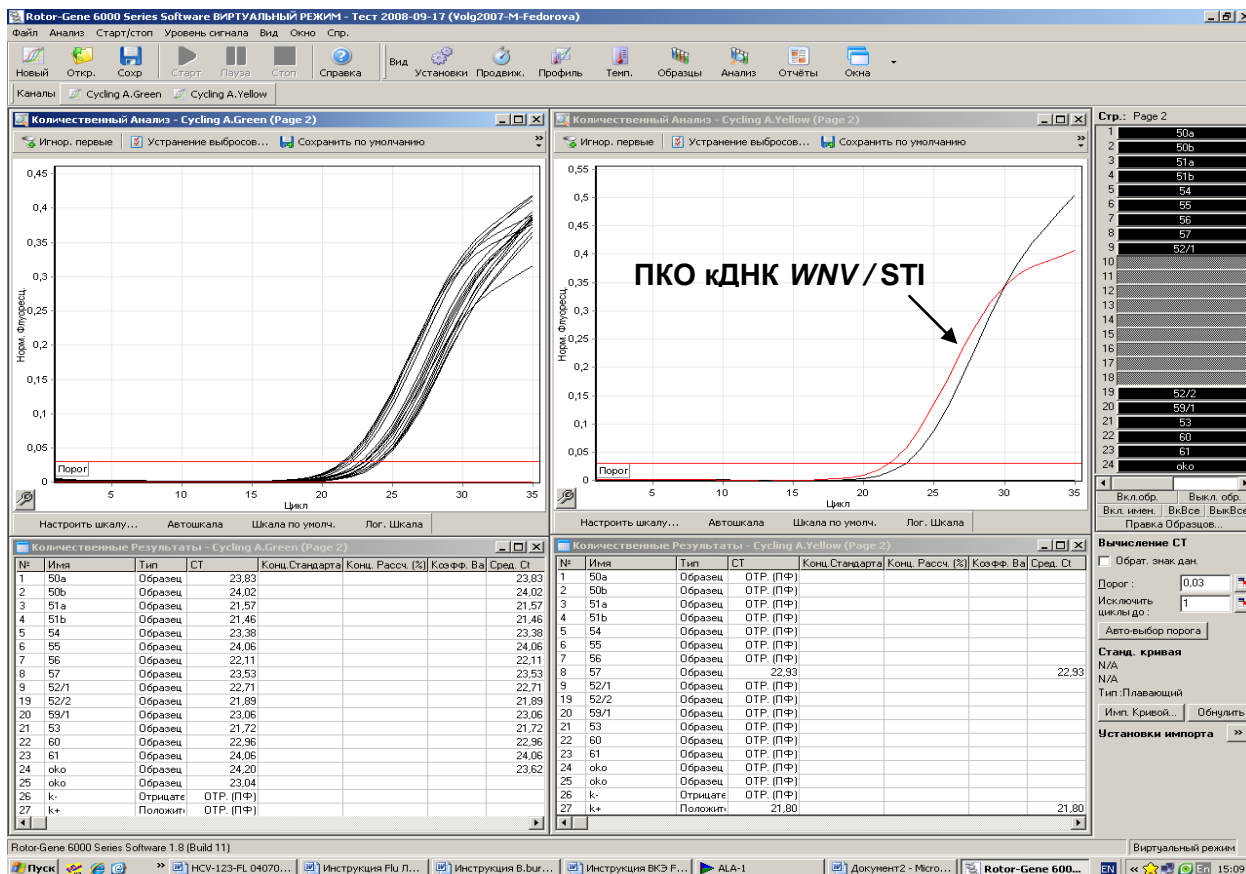
ВНИМАНИЕ! В случае, если кривые флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow не соответствуют экспоненциальному росту (не имеют S-образный вид), допускается увеличение значения порога отрицательных проб (***NTC threshold/ Порог Фона – ПФ***) до 10 %.

Интерпретация результатов

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

Пример амплификации на приборе Rotor-Gene 6000



Проба 57 содержит РНК WNV.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, 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, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

2. Запустить программу **iCycler iQ/iQ5**.

3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

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

Создание шаблона для проведения теста.

1. Задать схему планшета (расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала исследуемых образцах):

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

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

2. Задать программу амплификации.

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	56	30 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	56	30 с	FAM/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530	
	72	15 с	–	

- Для прибора **iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 4 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (файл с расширением .tmo) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

3. Поместить предварительно подготовленные пробирки в модуль в соответствии с

заданной схемой:

- Для прибора **iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Use Persistent Well Factors**. Амплификацию необходимо проводить с использованием такого же типа пластика, в котором проводилась калибровка прибора. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**. Выбрать тип крышек (**Seal Type – Domed cap**), тип пробирок (**Vessel Type – Tubes**).
 - Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Persistent Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
4. После окончания программы необходимо закрыть программу и выключить прибор (амплификатор и блок оптической системы).

Анализ результатов:

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора iCycler iQ/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 *C_t* в соответствующей графе в таблице результатов.

- Для прибора **iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по соответствующему каналу. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию).
- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyse Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок соответствующего канала. При этом должен быть выбран режим анализа

данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации кДНК ВКО:

1. Нажать в меню анализа данных **Data Analysis** кнопку **FAM**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. Установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 10**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold Position = 50**. Нажать **OK**.
4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации кДНК WNV:

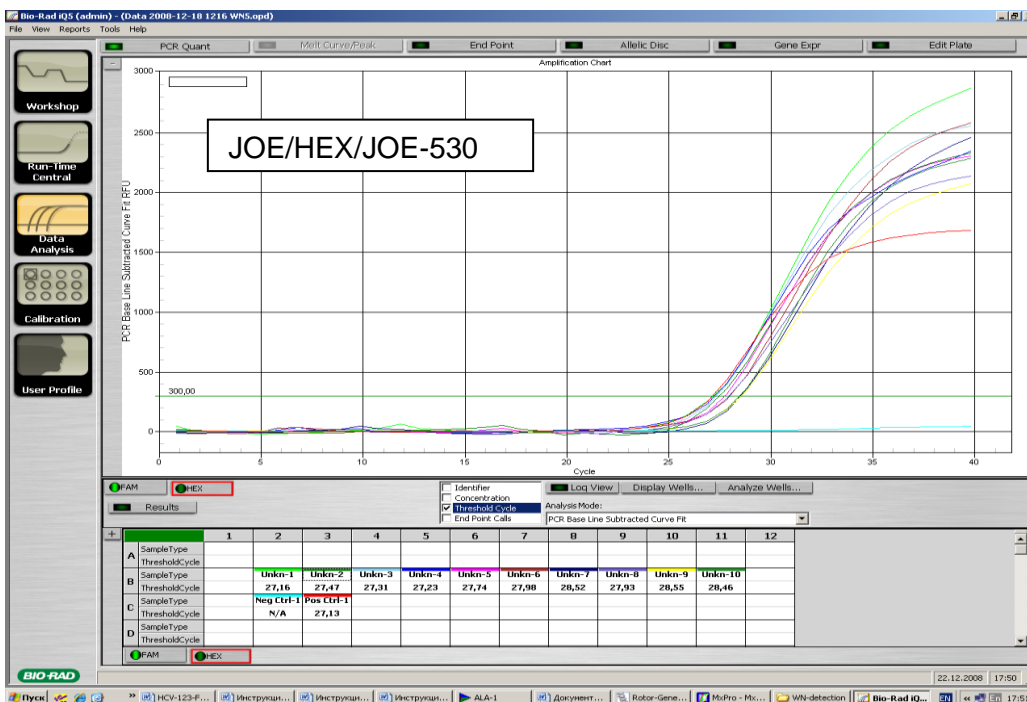
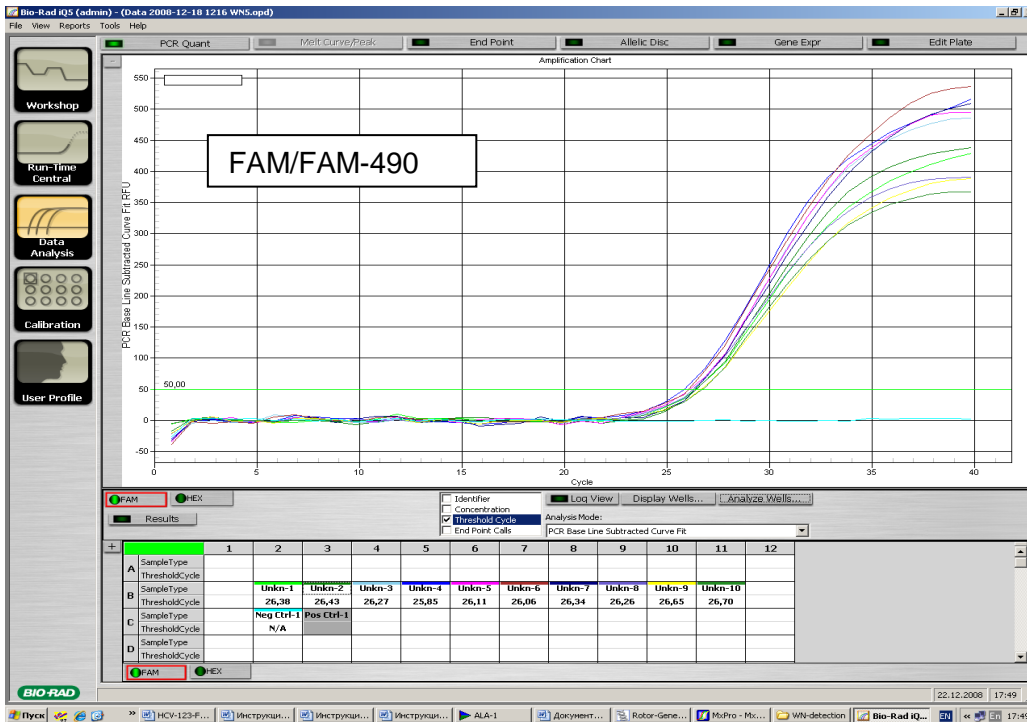
1. Нажать в меню анализа данных **Data Analysis** кнопку **JOE**.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию **Baseline Threshold**.
3. В открывшемся окне установить следующие параметры: в меню **Base Line Cycles** выбрать **User Defined, Select all, Edit Range** и задать **Start Cycle = 2, Ending Cycle = 10**; в меню **Crossing Threshold** выбрать **User Defined**, задать **Threshold Position = 200**. Нажать **OK**.
4. В таблице результатов (окно **Results**) появятся значения **Ct**.

Интерпретация результатов

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

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

Пример амплификации на приборе iQ5



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

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

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Включить прибор и запустить программу **Stratagene Mx3000P**.
2. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standarts)** 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 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**.
5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки, и обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры **FAM, JOE**.
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**.
8. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации.

Программа амплификации для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	56	30 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	56	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

9. В меню выбрать команду **Run**. Проверить правильность заданной программы амплификации. Нажать кнопку **Start**. Поставить галочку в окне **Turn lamp off at end of run**. Сохранить эксперимент.

Обработка и анализ данных

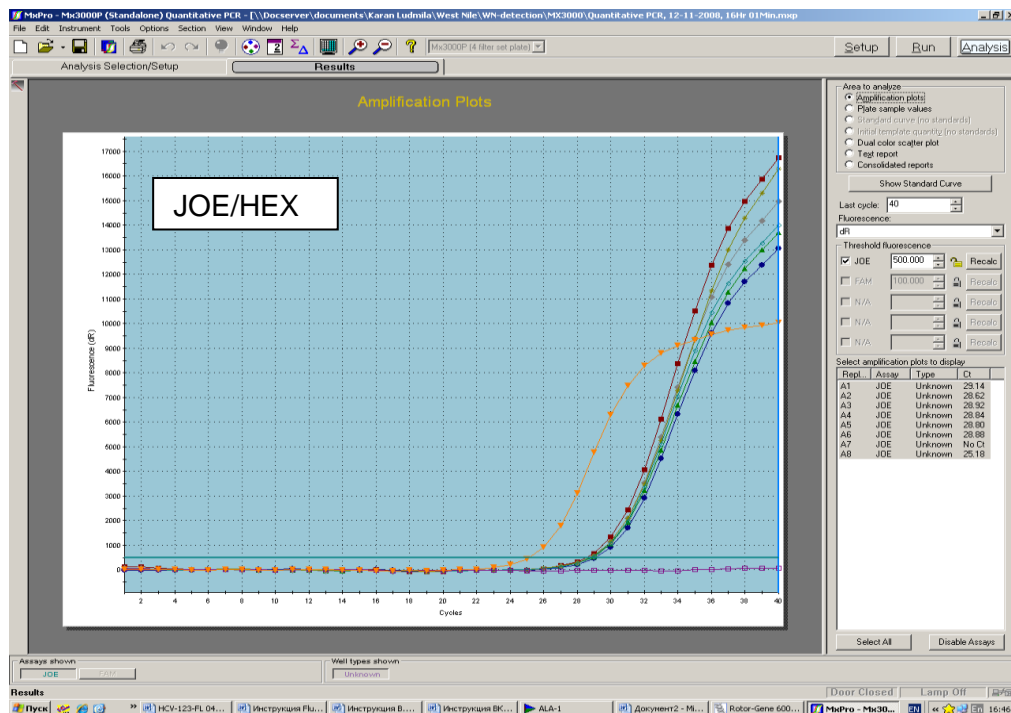
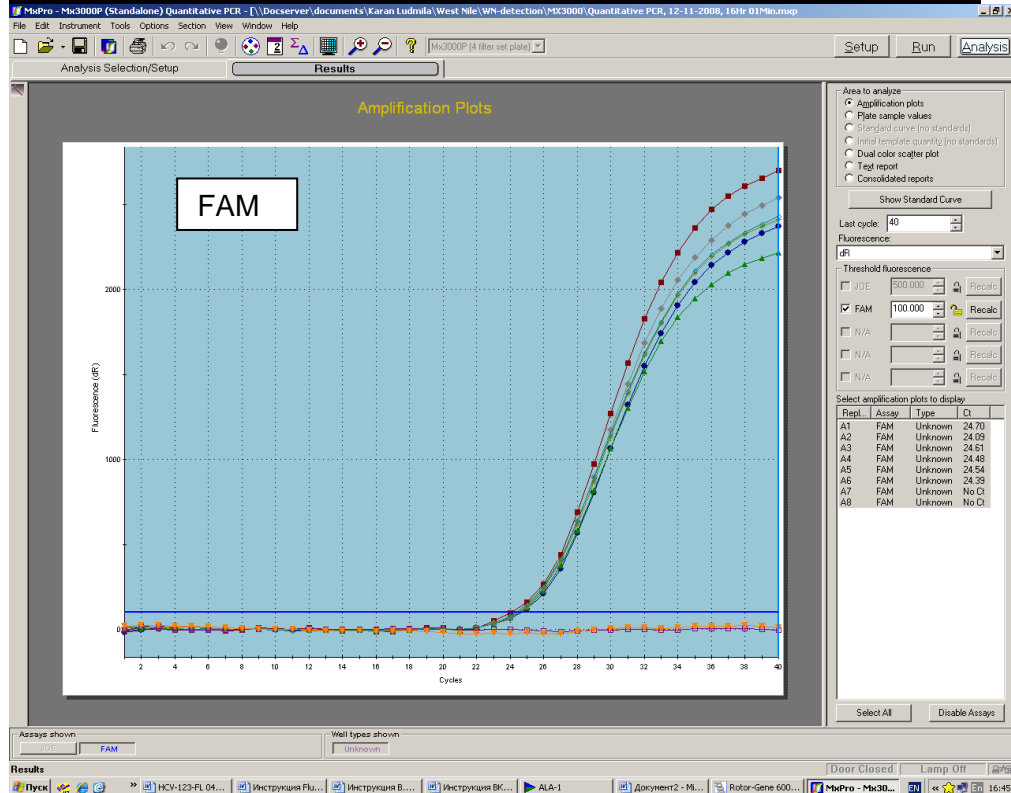
1. Открыть сохраненный файл данных и перейти в режим **Analysis**.
2. Активировать в меню окно **Results**.
3. В блоке **Area to analyze** выбрать строку **Amplification plots**.
4. В блоке **Threshold fluorescence** для каждого из каналов установить уровень пороговой линии на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер: для канала FAM рекомендуется выбрать уровень пороговой линии равный 150, для канала JOE/HEX – 500. 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.
5. В блоке **Area to analyze** выбрать строку **Text report**.

Интерпретация результатов

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

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

Пример амплификации на приборе Mx3000P (Stratagene, США)



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

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

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу RealTime_PCR v.7.3 и выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. 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**.

Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** на верхней панели выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста «АмплиСенс® WNV-FL» и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – **Пороговый (Ct)**;
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль+, контроль-**,
 - **Контроли**: положительный (К+) – 1; отрицательный (К-) – 1;
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл.
 - **Флуорофоры** – **Fam, Hex** (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать **R6G** (FAM – BK; HEX – специфика)).
 - Задать программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	56	30 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	56	30 с	FAM, Hex/R6G	
	72	15 с	–	

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**АмплиСенс® WNV-FL**», указать количество образцов, нажать **ОК**.
4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
6. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

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

7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку.
8. **Выключить прибор по завершении амплификации.**

Использование готового шаблонного файла для проведения теста


Для запуска прибора можно также использовать ранее созданный шаблон теста с заданными параметрами амплификации и заданным количеством контролей. Для этого:

- во вкладке **Протокол** нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**АмплиСенс® WNV-FL**», указать количество образцов, нажать **ОК**,

- присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
- в меню **Запуск программы амплификации** проверить правильность выбранной программы амплификации и объема реакционной смеси, заданных в шаблоне теста.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». 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.

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс)** для версии программы v.7.5. и выше).
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
 - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
 - **Величина Threshold –10 StD на участке линейного фитирования**
 - **Критерии достоверности результата:** поставить галочку, нижняя граница/порог положительного результата – 10%, верхняя граница/порог нормализации данных – 10%.
 - **Нормализация данных** не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).Нажать кнопку **Применить**.
5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки Φ (отжать кнопку).**
6. Установить пороговую линию (**Threshold**) поочередно для каждого из каналов на определенном уровне в соответствии с табл. 1. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** (переключение в логарифмический вид). Уровень пороговой линии устанавливается как % от максимального уровня флуоресценции положительного контроля амплификации (**K+**) в последнем цикле

амплификации, зарегистрированного на соответствующем канале. Для установки пороговой линии на определенном уровне необходимо перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой).

Таблица 1

Канал	Уровень пороговой линии, % от максимально уровня флуоресценции образца K+
Fam	5
Hex/R6G	3

Интерпретация результатов

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

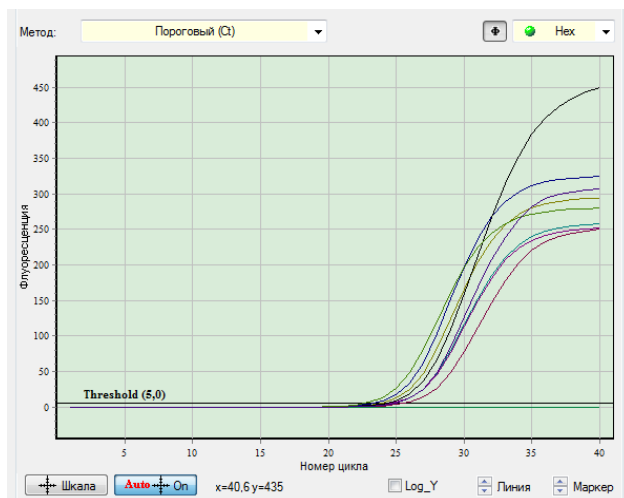
Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы RealTime PCR v.7.3. и выше.

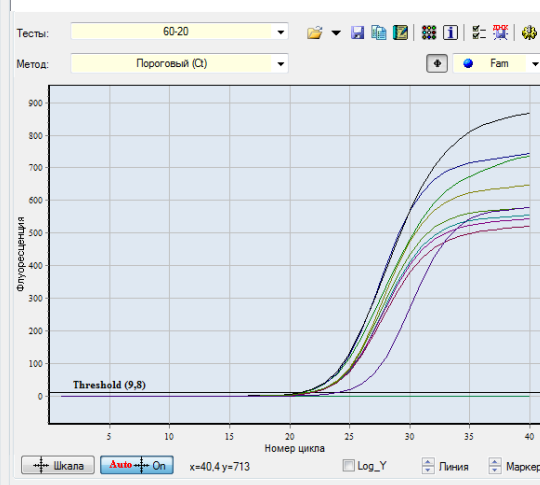
Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид)	Установить линию порога так, чтобы она пересекала только сигмообразные кривые накопления флуоресценции или на высоте $\frac{1}{4}$ от высоты между конечным значением флуоресценции отрицательных и положительных образцов
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Повторная амплификация для данного образца

Пример амплификации на приборе ДТ-96 («ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Данные по каналу HEX



Данные по каналу FAM



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 и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	56	30 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	56	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	50,0	C for 30:00
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second	
2	95,0	C for 15:00
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second	
→ 3	95,0	C for 0:05
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second	
4	56,0	C for 0:30
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second	
5	72,0	C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second	
6	GOTO 3	, 4 more times
→ 7	95,0	C for 0:05
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second	
8	56,0	C for 0:30
	+ Plate Read	
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second	
9	72,0	C for 0:15
← 10	GOTO 7	, 39 more times
	END	

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. 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.
 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 *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

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.

Установить пороговую линию поочередно для каждого из каналов на определенном уровне в соответствии с табл. 2. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид). Уровень пороговой линии устанавливается как % от максимального уровня флуоресценции положительного контроля амплификации (**K+**) в последнем цикле амплификации, зарегистрированного на соответствующем канале. Для установки пороговой линии на определенном уровне необходимо перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой).

Канал	Уровень пороговой линии, % от максимально уровня флуоресценции образца K+
FAM	10
HEX	5

3. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов.

Интерпретация результатов

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

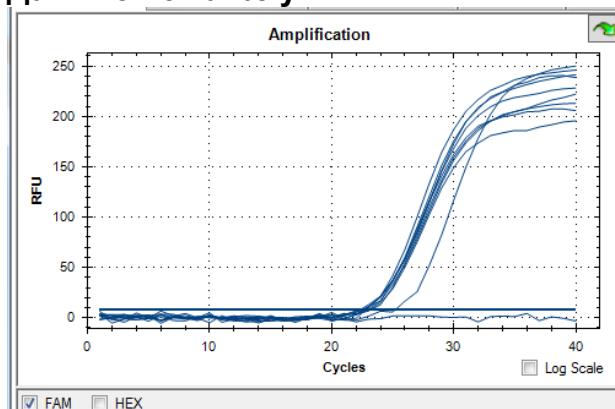
Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

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

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)	Установить линию порога так, чтобы она пересекала только сигмообразные кривые накопления флуоресценции или на высоте $\frac{1}{4}$ от высоты между конечным значением флуоресценции отрицательных и положительных образцов
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Повторная амплификация для данного образца

Пример амплификации на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).

Данные по каналу FAM



Данные по каналу HEX

