

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для одновременного выявления ДНК вируса гепатита В
(*HBV*) и РНК вируса гепатита D (*HDV*) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *HBV / HDV-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 (BIOMÉRIEUX, ФРАНЦИЯ).....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ ROTOR-GENE 3000 И ROTOR-GENE 6000 (CORBETT RESEARCH, АВСТРАЛИЯ)	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LINEGENE 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD).....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА ICYCLER IQ5 (BIO-RAD, США)	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА MX3000P (STRATAGENE, США).....	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», РОССИЯ).....	21
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (BIO-RAD, США)	25

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для одновременного выявления РНК вируса гепатита D (*HDV*) и ДНК вируса гепатита В (*HBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *HBV / HDV-FL*» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США),
- CFX96 (Bio-Rad, США),
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США),
- «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия),

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
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
Канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red

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

ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ

NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)

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

Порядок работы

Вариант 1. Выделение РНК/ДНК из образца объемом 100 мкл и лизис 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/ДНК-плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – 0,1 ml, объем элюции (**Eluate**) – 55 mkl, тип образца (**Type**) – Lysed, очередность выделения РНК/ДНК в образцах (**Priority**) – normal.
3. Создать новый протокол выделения РНК/ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing-No, On-board Lysis Incubation-No**.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В пробирки, предназначенные для выделения РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, раскapat по **450 мкл буфера для лизиса NucliSens**.
6. В каждую пробирку добавить **100 мкл исследуемой плазмы** одноразовым наконечником с фильтром, тщательно перемешать пипетированием.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контрольный образец (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО HBV / HDV-rec**, тщательно перемешать пипетированием.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контрольный образец (ОК)**. Для этого в пробирку с буфером для лизиса NucliSens добавить **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.
9. Оставить пробирки на 10 мин при комнатной температуре для прохождения

лизиса.

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

ВНИМАНИЕ! При выделении образца для проведения нескольких различных исследований (допустимо одновременное выделение нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

Таблица 1

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

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

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

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

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

1. Поставить флакон с буфером для лизиса NucliSens в прибор.
2. Для повышения чувствительности метода объем исследуемой плазмы может варьировать от 100 мкл до 1 мл. При этом лизис образца происходит в автоматическом режиме в приборе NucliSENS easyMAG, а объем буфера для лизиса NucliSens увеличивается до 2 мл. Для этого в каждую пробирку, предназначенную для выделения РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить от 100 мкл до 1 мл исследуемой плазмы одноразовым наконечником с фильтром.
3. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контрольный образец (ПК)**. Для этого в пробирку с буфером для лизиса NucliSens добавить

- 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО HBV / HDV-рес**, тщательно перемешать пипетированием.
4. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контрольный образец (ОК)**. Для этого в пробирку с буфером для лизиса NucliSens добавить **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.
 5. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
 6. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для выделения РНК/ДНК-плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – от 100 мкл до 1 ml, в зависимости от объема используемого клинического материала, объем элюции (**Eluate**) – 55 мкл, тип образца (**Type**) – Primary, очередность выделения РНК/ДНК в образцах (**Priority**) – normal.
 7. 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**.
 8. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
 9. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения РНК/ДНК с лизисом образцов в приборе (**on board**).
 10. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State-Idle** (приблизительно 15 мин).
 11. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и ВКО ICZ-рес одноразовыми наконечниками с фильтрами (см. табл. 1).
- ВНИМАНИЕ!** При выделении образца для проведения нескольких различных исследований (допустимо одновременное выделение нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).
12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую пробирку одноразовым наконечником по **20 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и ВКО ICZ-рес**. Каждую пробирку тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора одноразовыми наконечниками с фильтрами на 1000 мкл.
 13. Запустить на приборе программу продолжения выделения РНК/ДНК.
 14. После окончания выделения РНК/ДНК, извлечь пробирки из прибора и не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК/ДНК провести реакцию ОТ-

ПЦР.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000 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 *HCV* и одновременного выявления *HBV* и *HDV*, следует сначала поместить в ротор пробирки с реагентами для одновременного выявления *HBV* и *HDV*.

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 Rotor/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. 2):

Таблица 2

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

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

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

Примечание – Канал Cy5/Red включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.

6. Нажать кнопку **ОК/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн..**
- осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-МЫХ**);
 - калибровать перед первым измерением (**Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
 - установка калибровки канала для всех красителей от 5FI до 10FI (кнопка **Edit...**, окно **Auto gain calibration channel settings**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
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 и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип **None/Пусто**.

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

Анализ результатов реакции амплификации ДНК HBV (канал JOE/Yellow):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) необходимо активировать кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
5. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона - ПФ**) равным **15 – 25 %**.
6. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения Ct.

Анализ результатов реакции амплификации кДНК HDV (канал ROX/Orange):

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, 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%**.

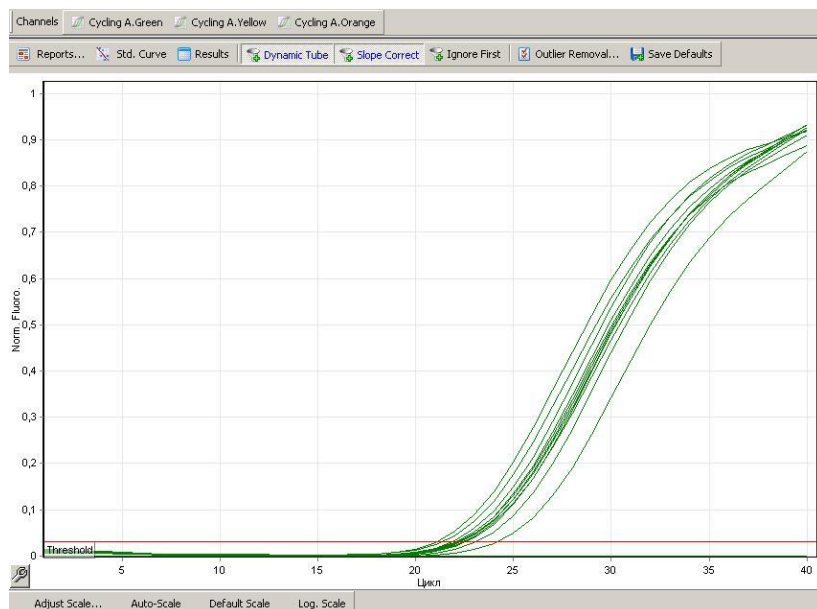
- В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM/Green):

- Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.03**.
- Выберите параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC threshold /Порог Фона – ПФ**) равным **10%**.
- В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения Ct для ВКО.

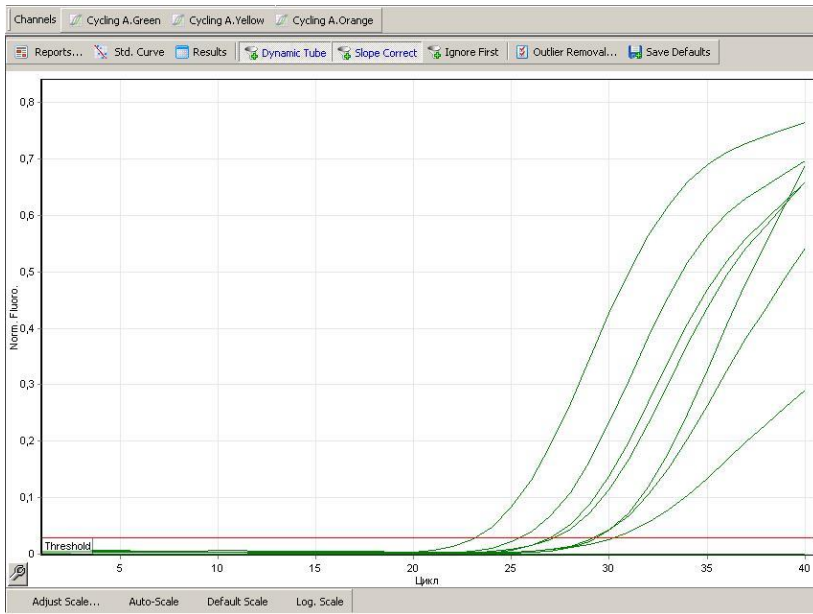
Пример полученных результатов

Данные по каналу FAM/Green – ВКО:

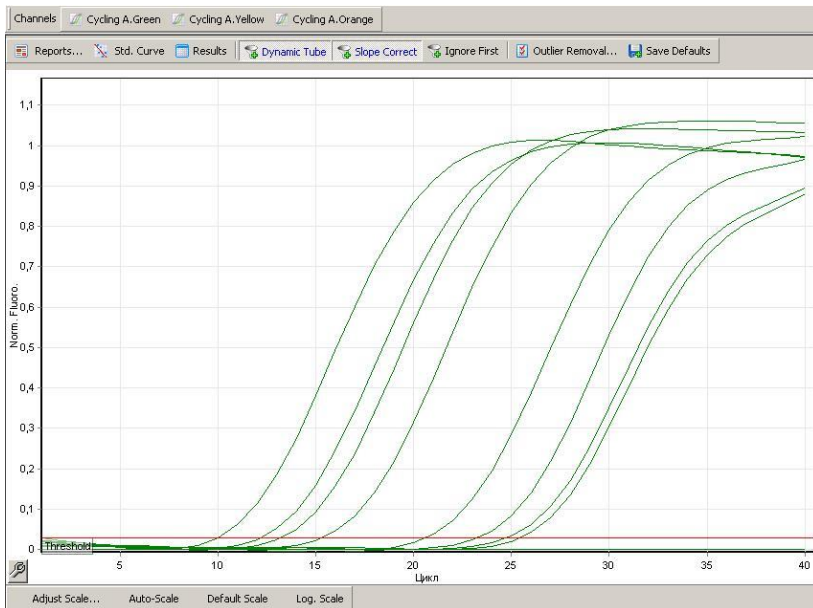


Данные по каналу JOE/Yellow – образцы, содержащие ДНК HBV:

Rotor-Gene 3000/6000 и Rotor-Gene Q



Данные по каналу ROX/Orange – образцы, содержащие РНК HDV:



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

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad, США)

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

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-2 iQ» для приборов планшетного типа

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

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

Примечание – Канал Cy5 включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.

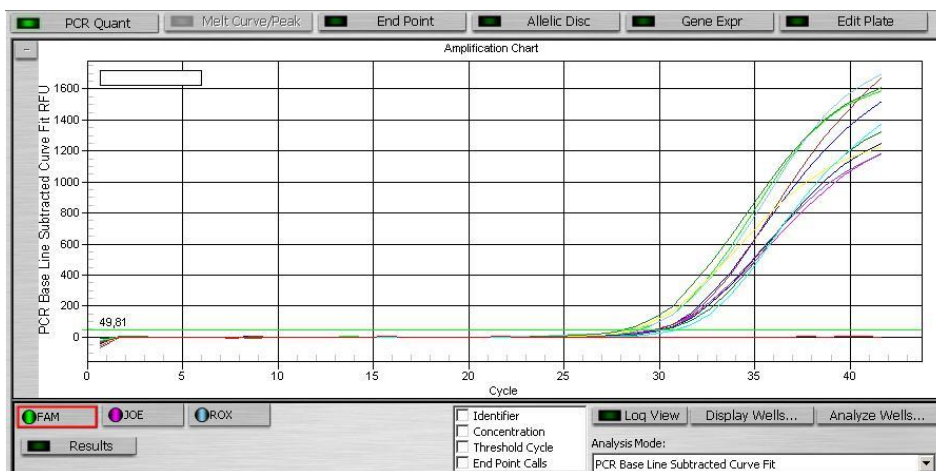
3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.
5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, для всех образцов задать измерение флуоресценции по каналам: FAM, JOE/HEX и ROX.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

Анализ результатов:

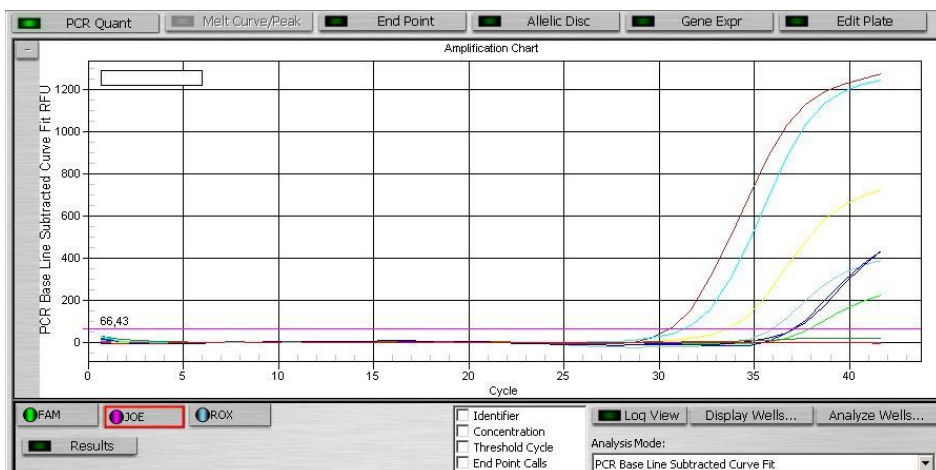
1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого в модуле **Workshop** нажать **Data file** и выбрать файл данных. Перейти в режим **Data Analysis**.
2. Просмотреть данные отдельно по каждому каналу.
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая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

Пример полученных результатов.

Данные по каналу FAM – ВКО:



Данные по каналу JOE/HEX – образцы, содержащие ДНК HBV:



Данные по каналу ROX – образцы, содержащие РНК HDV:



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

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

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

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

Таблица 4

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

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

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

Примечание – Канал Су5 включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот канал.

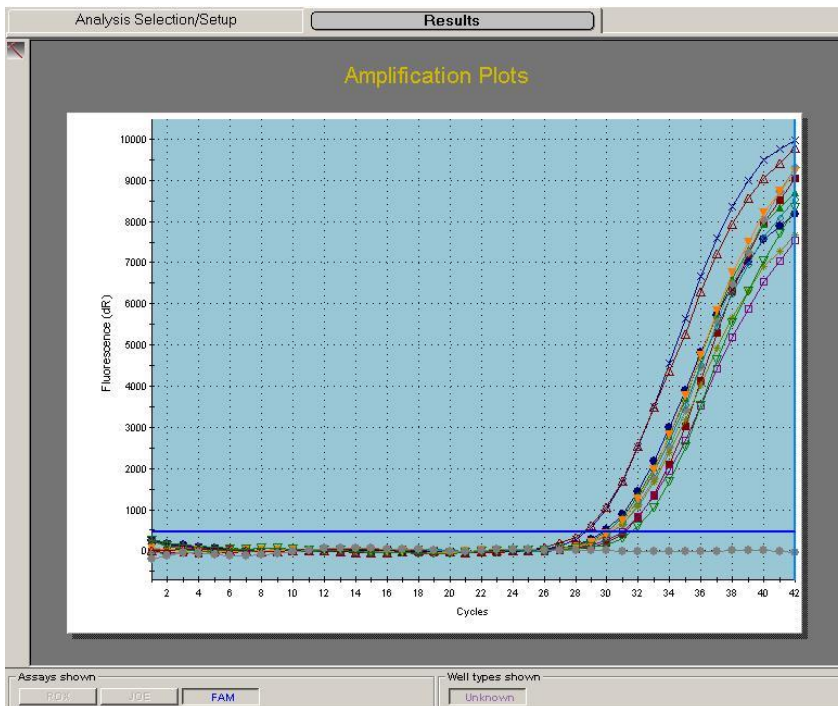
10. Запустить программу амплификации, нажав кнопку **Run**, затем **Start**, и ввести имя файла.

Анализ результатов:

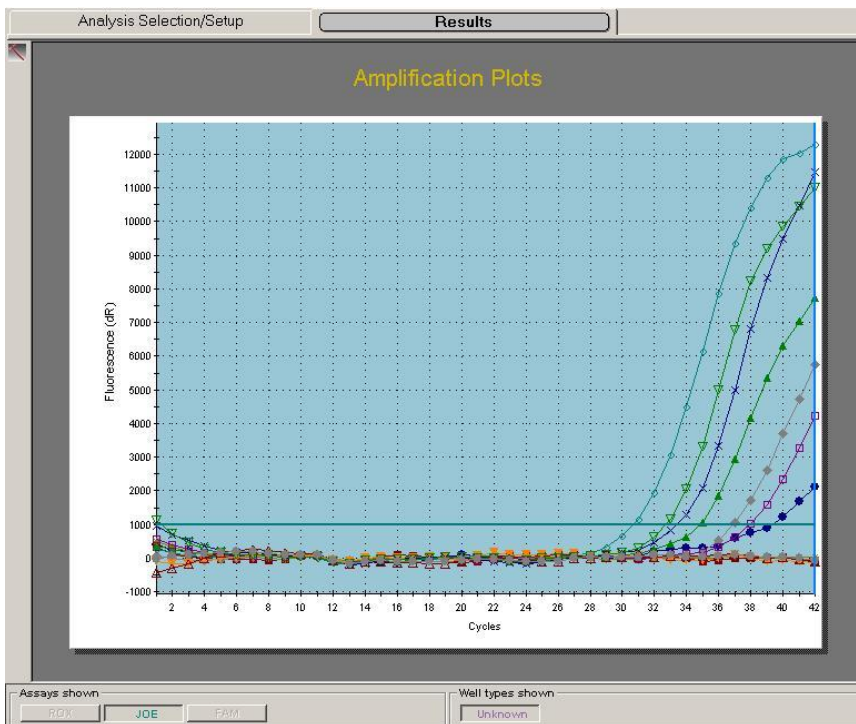
1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки соответствующие образцам должны иметь другой оттенок).
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Для каждого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

Пример полученных результатов

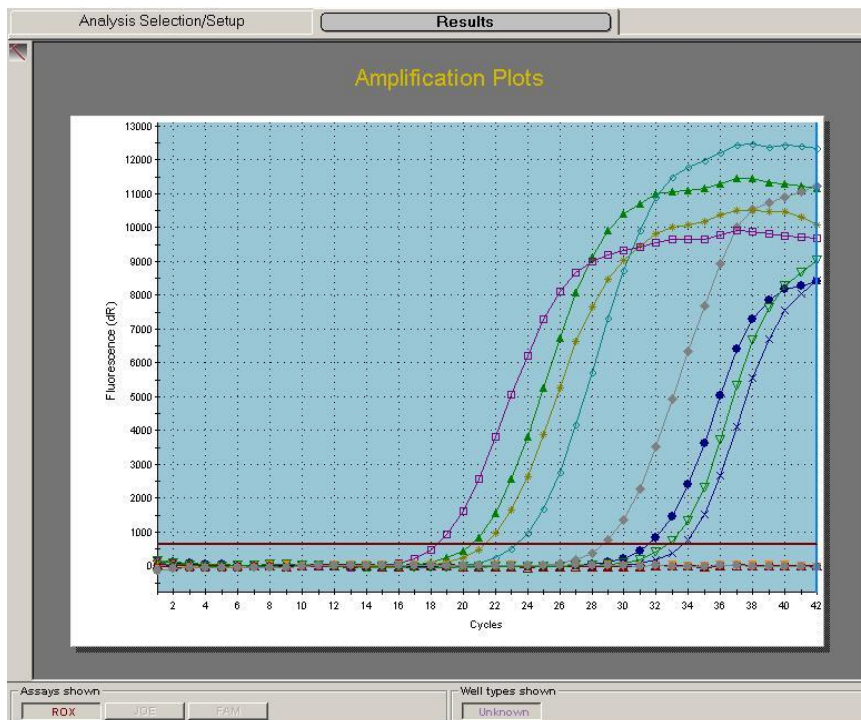
Данные по каналу FAM – ВКО:



Данные по каналу JOE/HEX – образцы, содержащие ДНК HBV:



Данные по каналу ROX – образцы, содержащие РНК HDV:



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

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

1. Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR v.7.3. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – **HBV-HDV-FL** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный
 - **Метод** – Пороговый (Ct)
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль –
 - **Контроли: положительный (K+) – 1, отрицательный (K-) – 1.**
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл
 - **Флуорофоры** – **FAM** – ВК; **Hex** – специфика; **ROX** – специфика.
 - Задать программу амплификации (см. табл. 5) и нажать **ОК**.

Таблица 5

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

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

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

Примечание – Канал Cy5 включается при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используется этот каналы.

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

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

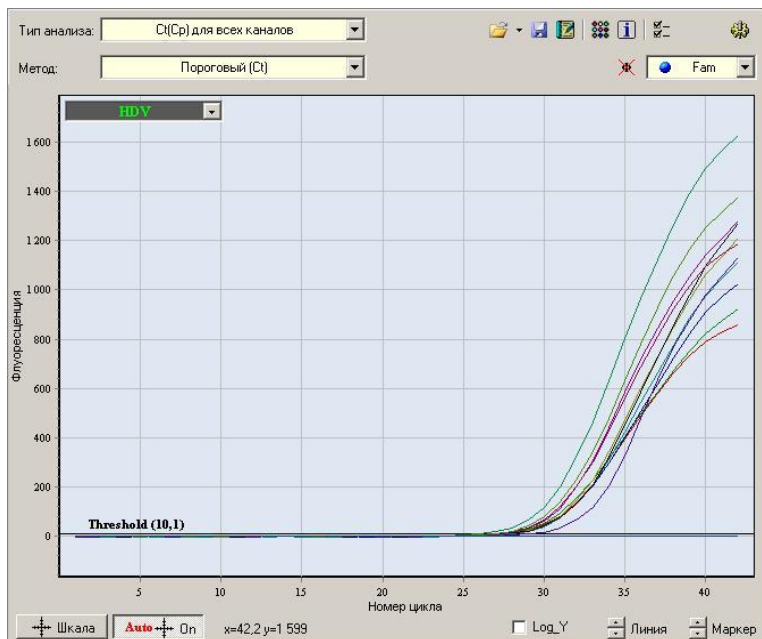
7. Последовательно нажать кнопки **Закрывать блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент.

Анализ результатов:

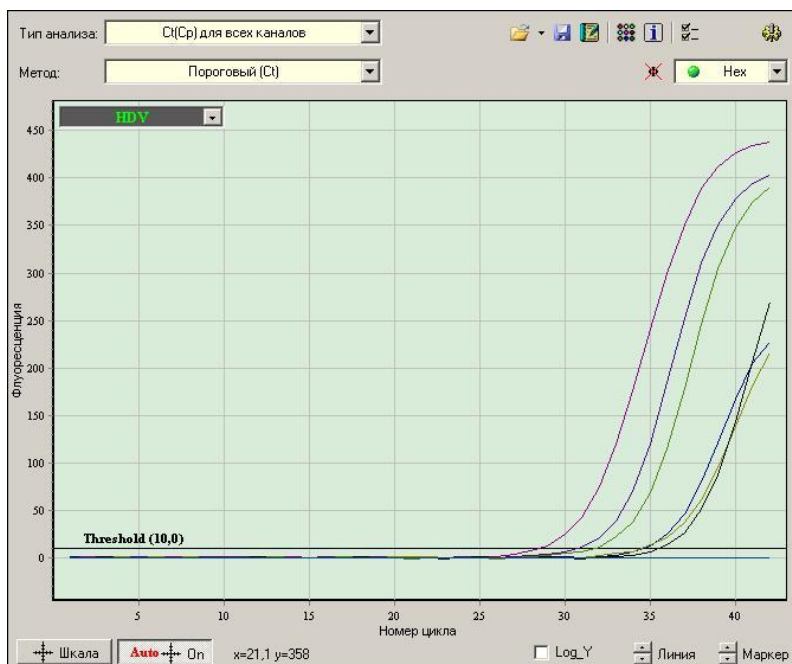
1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: St(Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить **Критерий положительного результата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

Пример полученных результатов.

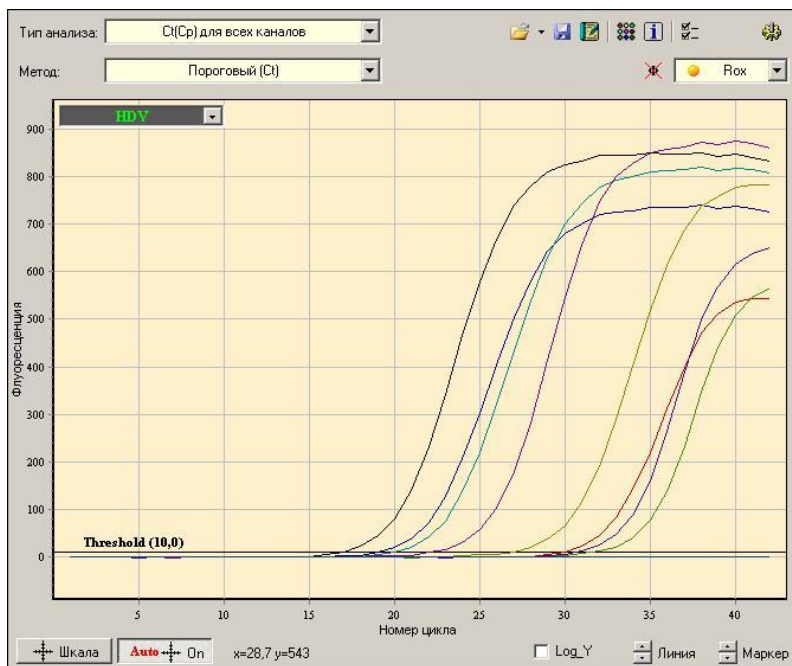
Данные по каналу Fam – ВКО:



Данные по каналу Hex – образцы, содержащие ДНК HBV:



Данные по каналу Rox – образцы, содержащие РНК HDV:



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad, США)

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

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

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor - New** задать параметры амплификации (время, температуру циклирования, количество циклов и указать шаг считывания флуоресцентного сигнала – см. табл. 6). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**.

Таблица 6

Программа амплификации «АмплиСенс-2» для приборов планшетного типа

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

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

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в

одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

4. Сохранить протокол, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New** и задать имя файла. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой во вкладке **Protocol**, нажав на кнопку **Select Existing....**

Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.

5. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores....**, выбрать галочками все флуорофоры, используемые в данной постановке и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов.

6. Сохранить схему планшета, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New** и задать имя файла. Выбрав или отредактировав нужную схему планшета, назначить ее использование, нажав кнопку **OK** в нижней части окна.

7. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Из вкладки **Start Run** запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки. Сохранить эксперимент.

8. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

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

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора HEX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *HBV*,
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *HDV*.

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

Вариант 1

Поочередно для каждого канала установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Вариант 2

Поочередно для каждого канала отметить галочкой **Log Scale**. Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер.

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