

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека (ФБУН
ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора)



В.Г. Акимкин

«05» февраля 2020 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению наборов реагентов для количественного определения РНК вируса гепатита С (HCV), ДНК вируса гепатита В (HBV) и РНК вируса гепатита D (HDV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® HCV-Монитор-FL»

«АмплиСенс® HBV-Монитор-FL»

«АмплиСенс® HDV-Монитор-FL»

Формат FRT

АмплиСенс®



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

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия)	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P (Stratagene, США)	18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	22
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	26
РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ В ИССЛЕДУЕМЫХ И КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ПРИ ПОМОЩИ ПРОГРАММЫ AmpliSens Soft Monitor FRT	29

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании наборов реагентов **формата FRT** для количественного определения РНК вируса гепатита С (*HCV*) – «АмплиСенс® *HCV*-Монитор-FL», ДНК вируса гепатита В (*HBV*) – «АмплиСенс® *HBV*-Монитор-FL» и РНК вируса гепатита D (*HDV*) – «АмплиСенс® *HDV*-Монитор-FL» в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
- iCycler iQ5, (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США),
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов ¹
Канал для флуорофора FAM	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
Канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red
Канал для флуорофора Cy5.5	Cy5.5/Crimson/Quasar705

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

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; **Форма 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; **Форма 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Форма 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! В соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008 и ГОСТ 31340-2013

следующие реагенты подлежат маркировке, как содержащие опасные вещества:











Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 ²			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м ³	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Лизирующий раствор	 Опасно (Danger)	 Опасно (Danger)	Гуанидин хлорид	Нет данных			
			Тритон X-100	Нет данных			
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	 Опасно (Danger)	 Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
			Гуанидин тиоцианат	Нет данных			
			Тритон X-100	Нет данных			
			1-Тиоглицерол	Нет данных			

² Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».









Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; **Форма 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; **Форма 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Форма 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 / **VER** 05.02.20 / стр. 4 из 29

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 ²				
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м ³	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны	
Раствор для лизиса	<p>Опасно (Danger)</p>	<p>Опасно (Danger)</p>	Гуанидин тиоцианат Тритон X-100 1-Тиоглицерол	Нет данных	Нет данных	Нет данных		
Раствор для отмывки 1	<p>Опасно (Danger)</p>	<p>Опасно (Danger)</p>	Гуанидин тиоцианат Тритон X-100	Нет данных	Нет данных			
Раствор для отмывки 3	<p>Предупреждение (Warning)</p>	<p>Предупреждение (Warning)</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется	

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 5 из 29

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 ²			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м ³	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для отмывки 4	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
Раствор для отмывки 5	   Опасно (Danger)	   Опасно (Danger)	Изопропанол Гуанидин тиоцианат	50/10	Пары	Класс опасности 3	Нет данных

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; **Форма 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; **Форма 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Форма 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 6 из 29

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 ²			
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м ³	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для отмытки 6	  <p>Предупреждение (Warning)</p> <p>H226: Воспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открытого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>	  <p>Предупреждение (Warning)</p> <p>H226: Воспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открытого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется
Раствор для отмытки 7	  <p>Опасно (Danger)</p> <p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость или головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открытого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>	  <p>Опасно (Danger)</p> <p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси. H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. H336: Может вызвать сонливость и головокружение. P210: Беречь от источников воспламенения/нагревания/искр/открытого огня. Не курить. P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей. P264: После работы тщательно вымыть руки. P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке. P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>	Ацетон	800/200	Пары	Класс опасности 4	Не требуется
			Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; **Форма 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; **Форма 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Форма 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 7 из 29

Наименование реагента	Элементы маркировки в соответствии с Регламентом (ЕС) 1272/2008	Элементы маркировки в соответствии с ГОСТ 31340-2013	Наименования опасных компонентов	по ГН 2.2.5.1313-03 ²				
				ПДК макс разовая / среднесменная, мг/м ³	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны	
Раствор для преципитации	  Опасно (Danger)	  Опасно (Danger)	Изопропанол	50/10	Пары	Класс опасности 3	Не требуется	
	<p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси</p> <p>H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение.</p> <p>H336: Может вызвать сонливость или головокружение.</p> <p>P210: Беречь от источников воспламенения/нагрева/искр/открытого огня. Не курить.</p> <p>P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей.</p> <p>P264: После работы тщательно вымыть руки.</p> <p>P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.</p> <p>P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке.</p> <p>P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>	<p>H225: Легковоспламеняющаяся жидкость. Пары образуют с воздухом взрывоопасные смеси</p> <p>H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение.</p> <p>H336: Может вызвать сонливость или головокружение.</p> <p>P210: Беречь от источников воспламенения/нагрева/искр/открытого огня. Не курить.</p> <p>P261: Избегать вдыхания газа/пара/пыли/аэрозолей.</p> <p>P264: После работы тщательно вымыть руки.</p> <p>P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.</p> <p>P403 + P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте в плотно закрытой/герметичной упаковке.</p> <p>P501: Упаковку/содержимое удалить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 "САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЩЕНИЮ С МЕДИЦИНСКИМИ ОТХОДАМИ".</p>						

Примечание

ПЦР-смесь-1-FL HBV, ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV,, ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HDV,, ОКО	Концентрация опасного вещества (натрия азид) не более 0,125% - данные реагенты не классифицируются как опасные, не подлежат маркировке опасности и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности. При работе с данными реагентами необходимо соблюдать меры предосторожности, указанные в инструкции по применению	Натрия азид	Нет данных
--	---	-------------	------------

ВНИМАНИЕ! При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91.

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 / **VER** 05.02.20 / стр. 8 из 29

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

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для англоязычной версии программы 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 – 50 мкл**. Нажать кнопку **Next/Далее**.

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 / **VER** 05.02.20 / стр. 9 из 29

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

Таблица 1

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

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	50	15 мин	–	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	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.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

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

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**);

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /

- 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**.

ВАЖНО! Для ДНК-калибраторов KB1 и KB2 выбрать тип **Standart/Стандарт** и в колонке **Given conc./Концентрация** ввести значения указанные во вкладыше к данной серии набора реагентов.

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

Анализ результатов реакции амплификации кДНК/ДНК специфической мишени (HCV, HBV или HDV) (канал JOE/Yellow):

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

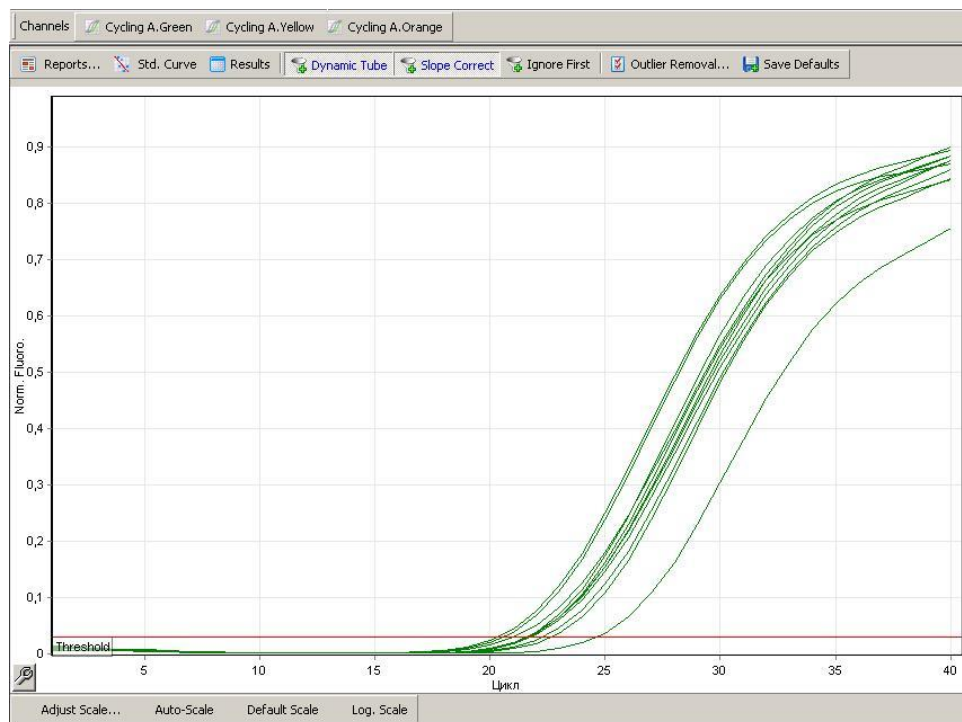
Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM/Green):

Формат FRT Форма 1: [REF] TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0351-1-1; [REF] TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0311-1-1; Форма 2: [REF] TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0352-1-1; [REF] TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0312-1-1; Форма 4: [REF] TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0354-1-1; [REF] TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0314-1-1; Форма 5: [REF] R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0355-1-14; [REF] R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0315-1-14; [REF] R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-2805-1-14-0 /

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

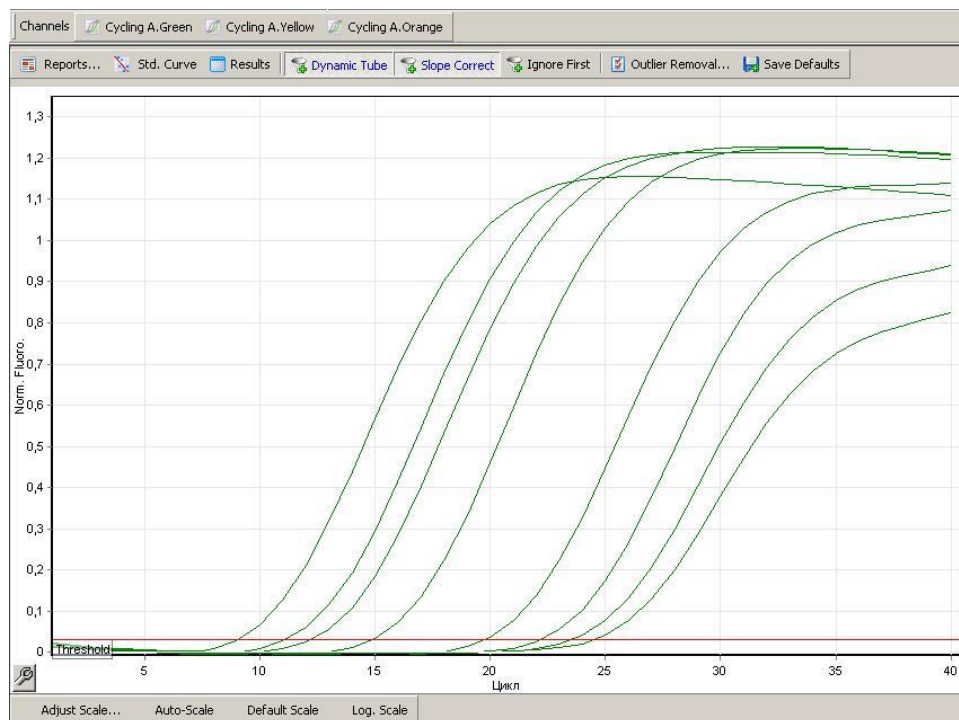
Пример полученных результатов

Данные по каналу FAM/Green – ВКО:



Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; **Форма 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; **Форма 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Форма 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /

Данные по каналу JOE/Yellow – образцы, содержащие специфическую мишень:



Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; **Форма 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; **Форма 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Форма 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /

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

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

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

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt) **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 14 из 29

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование 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).

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. 2).

Таблица 2

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		

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /

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.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Примечание – Каналы *ROX* и *Sy5* включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

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

ВАЖНО! Для ДНК-калибраторов *KB1* и *KB2* выбрать тип *Std (Standart)* и в колонке *Quantity* ввести значения указанные во вкладке к данной серии набора реагентов.

6. Задать объем реакции **Sample Volume 50** 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 значении, при котором кривые флуоресценции носят линейный характер и не

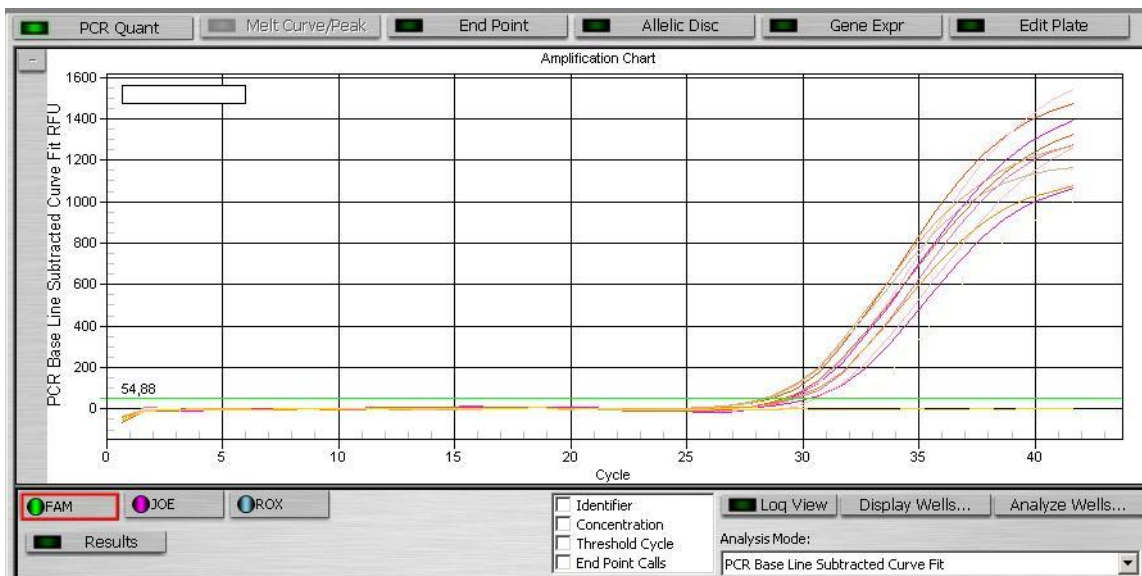
Формат FRT Форма 1: [REF] TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0351-1-1; [REF] TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0311-1-1; Форма 2: [REF] TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0352-1-1; [REF] TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0312-1-1; Форма 4: [REF] TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0354-1-1; [REF] TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0314-1-1; Форма 5: [REF] R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0355-1-14; [REF] R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0315-1-14; [REF] R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-2805-1-14-0 /

пересекают кривых отрицательных образцов.

- Для анализа результатов активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).

Пример полученных результатов

Данные по каналу FAM – ВКО:



Данные по каналу JOE/HEX – образцы, содержащие специфическую мишень:



Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 17 из 29

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 пробирки или стрипы, и обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**.

ВАЖНО! Для ДНК-калибраторов KB1 и KB2 выбрать тип **Standard** и в колонке **Standard quantity** ввести значения указанные во вкладке к данной серии набора реагентов.

7. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры FAM, JOE, ROX и Cy5.
8. В окне **Well Information** внести имя для каждого исследуемого образца.
9. 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.
10. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации (см. табл. 3).

Формат FRT Форма 1: [REF] TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0351-1-1; [REF] TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0311-1-1; Форма 2: [REF] TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0352-1-1; [REF] TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0312-1-1; Форма 4: [REF] TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0354-1-1; [REF] TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0314-1-1; Форма 5: [REF] R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0355-1-14; [REF] R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0315-1-14; [REF] R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-2805-1-14-0 /

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.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК HBV, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

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

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

Анализ результатов:

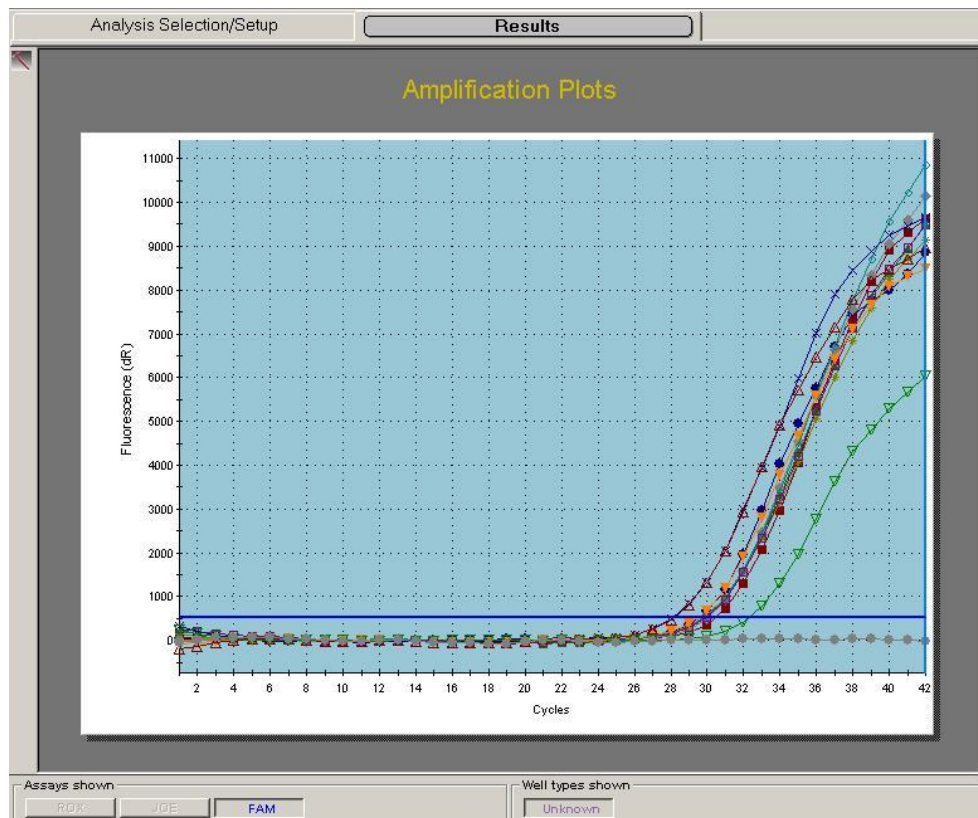
1. Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки, соответствующие образцам, должны иметь другой оттенок).
3. Перейти на вкладку **Results**.
4. Для каждого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

Формат FRT Форма 1: [REF] TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0351-1-1; [REF] TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0311-1-1; Форма 2: [REF] TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0352-1-1; [REF] TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0312-1-1; Форма 4: [REF] TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0354-1-1; [REF] TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0314-1-1; Форма 5: [REF] R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0355-1-14; [REF] R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0315-1-14; [REF] R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-2805-1-14-0 /

отображение каждого флуоресцентного канала в отдельности, просмотреть положение линии порога и, при необходимости, изменить его.

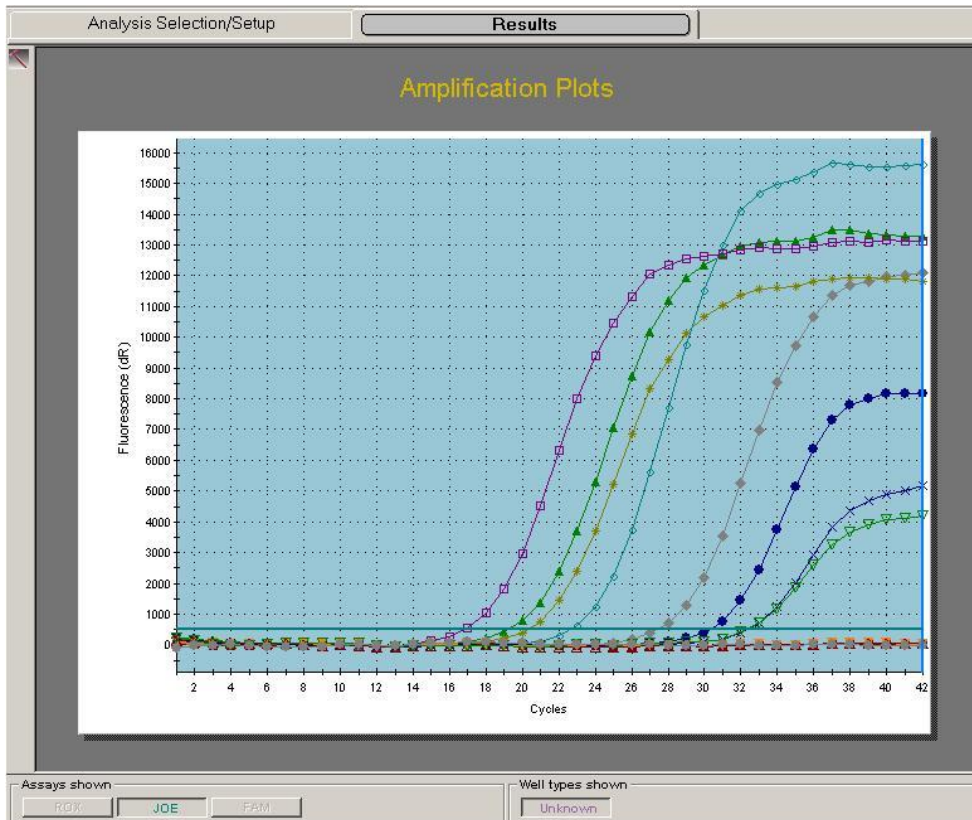
Пример полученных результатов

Данные по каналу FAM – ВКО:



Данные по каналу JOE/HEX – образцы, содержащие специфическую мишень:

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 20 из 29



Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; **Формат 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; **Формат 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Формат 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 21 из 29

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, 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).

1. Включить прибор и запустить программу «RealTime_PCR v.7.3». В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.
3. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста – **AC-monitor-FRT** – 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 – 50 мкл
 - Флуорофоры – FAM - BK; HEX - специфика.
 - Задать программу амплификации (см. табл. 4) и нажать «ОК».

Таблица 4

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	

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /

	72	15 с	–	
--	----	------	---	--

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для HBV, генотипирования HCV и др.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК HBV, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

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

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **AS-monitor-FRT**, 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 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.

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

Анализ результатов:

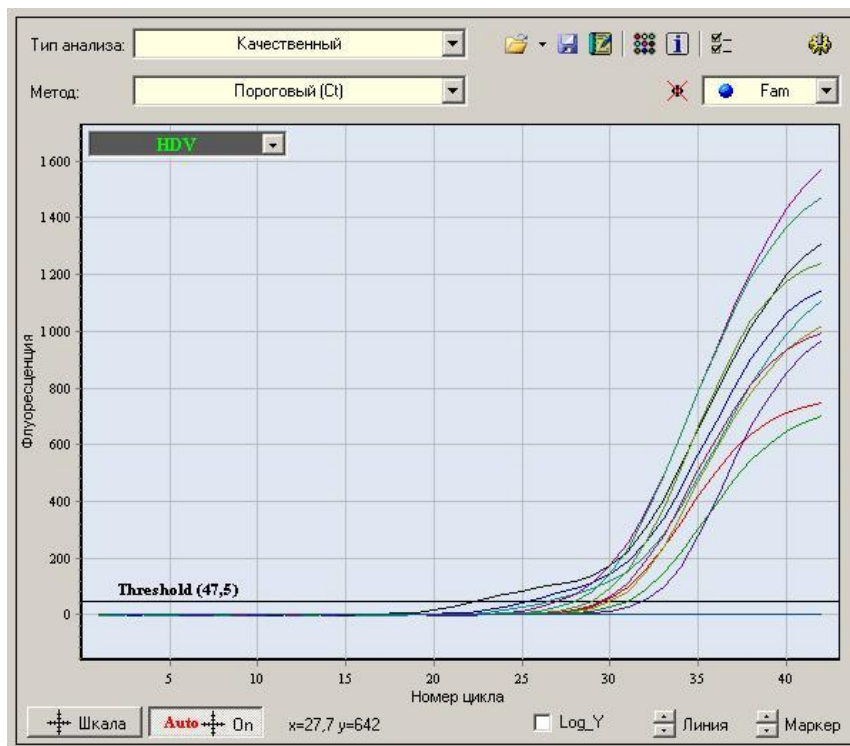
1. Перейти в режим **Просмотр архива** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct (Cp) для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа** и выставить **Критерий положительного результата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

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /

6. Нажать кнопку **Отчет (7)**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку «Мои документы»), выбрать формат «*.xls Excel» либо «*.rtf MS Word», выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

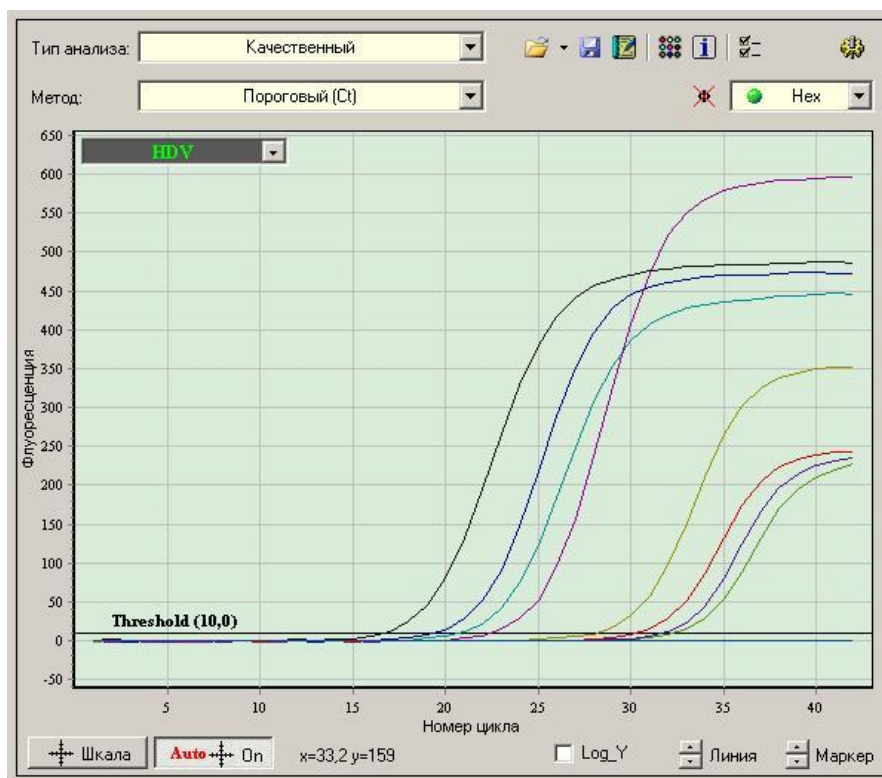
Пример полученных результатов

Данные по каналу Fam – ВКО:



Данные по каналу Нех – образцы, содержащие специфическую мишень:

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; **Форма 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; **Форма 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Форма 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 24 из 29



Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; **Формат 2:** **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; **Формат 4:** **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; **Формат 5:** **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 25 из 29

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, 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).

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 переворачивать 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. 5). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 50 мкл.**

Таблица 5

Программа амплификации «АмплиСенс-2» для приборов планшетного типа

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

Формат FRT Форма 1: **REF** TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0351-1-1; **REF** TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0311-1-1; Форма 2: **REF** TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0352-1-1; **REF** TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK1-0312-1-1; Форма 4: **REF** TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0354-1-1; **REF** TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK3-0314-1-1; Форма 5: **REF** R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0355-1-14; **REF** R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0315-1-14; **REF** R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-2805-1-14-0 /

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе.

Примечание – Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 мин) для экономии времени.

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

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

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

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

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

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

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

Формат FRT Форма 1: [REF] TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0351-1-1; [REF] TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0311-1-1; Форма 2: [REF] TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0352-1-1; [REF] TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0312-1-1; Форма 4: [REF] TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0354-1-1; [REF] TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0314-1-1; Форма 5: [REF] R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0355-1-14; [REF] R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0315-1-14; [REF] R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-2805-1-14-0 /

соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов).

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум 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 специфической мишени.

Во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в модуле и таблица со значениями пороговых циклов.

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.

Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...** возможно в появившемся окне задать название образцов и концентрации калибраторов.

Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.

Формат FRT Форма 1: [REF] TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0351-1-1; [REF] TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
[REF] HK2-0311-1-1; Форма 2: [REF] TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK1-0352-1-1; [REF] TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
[REF] HK1-0312-1-1; Форма 4: [REF] TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0354-1-1;
[REF] TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK3-0314-1-1; Форма 5: [REF] R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0355-1-14;
[REF] R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0315-1-14; [REF] R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-2805-1-14-0 /

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ В ИССЛЕДУЕМЫХ И КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ПРИ ПОМОЩИ ПРОГРАММЫ AmpliSens Soft Monitor FRT

Порядок обработки результатов с помощью программного обеспечения (ПО) AmpliSens Soft Monitor FRT указан во вкладке «Инструкция» данного ПО.

Формат FRT Форма 1: REF TR-V1-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt); REF HK2-0351-1-1; REF TR-V5-S-MC(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK2-0311-1-1; **Форма 2:** REF TR-V1-P-M(RG,iQ,Mx,Dt); REF HK1-0352-1-1; REF TR-V5-P-M(RG,iQ,Mx,Dt);
REF HK1-0312-1-1; **Форма 4:** REF TR-V1-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); REF HK3-0354-1-1;
REF TR-V5-M-MC(RG,iQ,Mx,Dt); REF HK3-0314-1-1; **Форма 5:** REF R-V1-MC(RG,iQ,Mx,Dt); REF H-0355-1-14;
REF R-V5-MC(RG,iQ,Mx,Dt); REF H-0315-1-14; REF R-V3-MC(RG,iQ,Mx,Dt) REF H-2805-1-14-0 /
VER 05.02.20 / стр. 29 из 29