

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов
для выявления РНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа)
в объектах окружающей среды и биологическом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Enterovirus 71-FL*»

Формат FRT

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	9
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США). ..	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США)	19
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	22

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления РНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа) в объектах окружающей среды и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *Enterovirus 71-FL*» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай);
- iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США).

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции (формат FRT)

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, Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene 6 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, США) или пробирок для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) (детекция через дно пробирки).

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор.
2. Поместить пробирки в ротор амплификатора так, чтобы первая пробирка попала в лунку 1; установить ротор в прибор, закрыть крышку (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

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

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
5. 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)/закреплено фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.

6. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
7. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать параметры амплификации:

Единая программа амплификации «АмплиСенс»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	детекция флуоресц. сигнала	

ВНИМАНИЕ! При использовании единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам FAM/Green и JOE/Yellow.

Примечание – При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция по всем используемым каналам.

8. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
9. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.**
 - а) осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - б) установить калибровки каналов FAM/Green, JOE/Yellow (нажать кнопку **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Автоматизация уровня сигнала**, указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал – 5**, **Max Reading/Максим. Сигнал – 10**);
 - в) осуществлять калибрование по каналам FAM/Green, JOE/Yellow 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**.

10. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
11. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
12. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К–», положительный – «К+». Напротив всех исследуемых образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контролей – тип **Positive control/Положительный контроль**, для отрицательного контроля экстракции – тип **Negative control/Отрицательный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC/ОТР. (ПФ)**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

Анализ результатов

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать** и **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии для каждого из основных открывшихся окон (FAM/Green и JOE/Yellow) **Threshold/Порог**.
3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню каждого основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,05**.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.
8. Значения **Ct** для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов ОК, К+, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

9. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения C_t , не превышающие граничное значение порогового цикла, указанное во вкладыше, считаются положительными.

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, 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 ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

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

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

2. Открыть программу iCycler iQ/iQ5.
3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

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 при установке в прибор.

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора:

1. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала:
 - для прибора **iCycler iQ5** 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**. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам FAM и JOE/HEX. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
 - для прибора **iCycler iQ** в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop** 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, JOE**. 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. Все клинические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-».
3. Задать программу амплификации:

Единая программа амплификации «АмплиСенс»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	детекция флуоресц. сигнала	

ВНИМАНИЕ! При использовании единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам FAM и JOE/HEX.

Примечание – При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция по всем используемым каналам.

- для прибора **iCycler iQ5** 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** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать программу амплификации, а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 2 – 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**.

4. Перед запуском выполнения программы:

- для прибора **iCycler iQ5** необходимо проверить правильность выбранного протокола (***Selected Protocol***) и схемы планшета (***Selected Plate Setup***). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант ***Collect Well Factors from Experimental Plate***. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- для прибора **iCycler iQ** в окне **Run Prep** необходимо проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант ***Experimental 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**.

5. После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

Анализ результатов проводится по каналам JOE/HEX и FAM. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого:

- для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**;
- 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**.

2. Просмотреть полученные данные. Для этого:

- для прибора **iCycler iQ5** выбрать режим анализа данных **Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию);
- для прибора **iCycler iQ** на вкладке **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).
3. Данные по каждому каналу просматривать отдельно.
 4. Установить уровень пороговой линии. Для этого:
 - для прибора **iCycler iQ5** в окне **Base Line Threshold** установить параметр **Base Line Cycles – Auto Calculated** (в случае «заваливания» кривых установить данный параметр в режим **User Defined, 2 through 10 cycles**), параметр **Crossing Threshold – Auto Calculated**. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов;
 - для прибора **iCycler iQ** в меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим автоматической установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **Auto Calculated**. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, то в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined** и повысить уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов.
 5. Для анализа результатов нажать кнопку **PCR Quant (iCycler iQ)** или активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (**iCycler iQ5**).
 6. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов ОК, К+, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
 7. Интерпретация результатов тестирования исследуемых образцов проводится в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие граничное значение порогового цикла, указанное во вкладыше, считаются положительными.

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 или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) (детекция через крышку пробирки).

1. Включить прибор и запустить программу **RealTime_PCR**. 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 – **Enterovirus** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный;
 - **Метод** – Пороговый (Ct);
 - **Пробирки** – образец;
 - **Контроли:** нет
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл;
 - **Флуорофоры** – Fam – специфика; Hex (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать R6G) – специфика;
 - Задать программу амплификации и нажать **ОК**.

Единая программа амплификации «АмплиСенс»

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	детекция флуоресц. сигнала	

ВНИМАНИЕ! При использовании единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Примечание – При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция по всем используемым каналам.

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **Enterovirus**, 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

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице 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 задать параметры:

Критерий положительного результата ПЦР – 90 %;

Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования.

Критерии достоверности результатов: нижняя граница/порог положительного результата – **5 % F (Cp)**, верхняя граница/порог нормализации данных – **30 % F (Cp)**.

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.

6. Значения Ct для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов ОК, К+, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
7. Нажать кнопку **Отчет**. Нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат ***MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML** либо ***xls Excel**, выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**
8. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения Ct , не превышающие значения порогового цикла, указанного во вкладыше, считаются положительными.

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. При использовании прибора **CFX96 (Bio-Rad, США)** рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

Программирование амплификатора

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). Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

Единая программа амплификации «АмплиСенс»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	детекция флуоресц. сигнала	

ВНИМАНИЕ! При использовании единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

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** 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 флуорофоры FAM и HEX, нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов.
Примечание – при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция по всем используемым каналам.
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**. 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).

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:
 - а) Поочередно для каждого канала установить уровень пороговой линии (перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши) на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов $K+$ в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции $K+$ должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.
 - б) 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. При нажатии кнопки панели инструментов **View/Edit Plate...** откроется окно, в котором можно дать название или переименовать образцы.
3. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов ОК, К+, К– в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
4. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие значения порогового цикла, указанного во вкладыше, считаются положительными.
5. Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ.

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

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

1. Включить прибор, запустить программу Mx3000P/Mx3005P.
2. В окне **New Experiment Options** выбрать пункт **Quantitative PCR (Multiple Standards)** и установить флажок **Turn lamp on for warm-up**.

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

3. Установить пробирки в прибор, закрыть фиксатор и дверцу прибора.
4. В меню **Options** выбрать пункт **Optics Configuration** и на вкладке **Dye Assignment** напротив пункта **JOE/HEX filter set** установить параметр JOE, напротив пункта **FAM filter set** установить параметр FAM.

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

5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - а) выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки или стрипы (удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью);
 - б) обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** установить два флажка FAM и JOE. Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно **Well Information**). Внести подписи образцов также можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню **Plate Setup**.

Задать программу амплификации. Для этого использовать один из следующих способов:

Использование шаблонного файла для задания программы амплификации (рекомендуется).

Перейти на вкладку **Thermal Profile Setup**. Нажмите кнопку **Import...** справа от изображения профиля термоциклирования. Перейти в папку, содержащую

предшествующий экспериментальный файл, и откройте его. В окне **Thermal Profile** появится необходимый профиль термоциклирования.

Самостоятельное программирование

1. Во вкладке **Plate Setup** выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки. Перейти в меню **Thermal Profile Setup**, задать программу амплификации:

Единая программа амплификации «АмплиСенс»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	детекция флуоресц. сигнала	

ВНИМАНИЕ! При использовании единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам FAM и JOE/HEX.

Примечание – При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция по всем используемым каналам.

ВНИМАНИЕ! Если данный комплект реагентов используется совместно с набором, для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию **All points** для параметра **Data collection marker by dragging** и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.

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

Анализ результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице 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). В противном случае выбрать все исследуемые образцы, удерживая клавишу **Ctrl** и выделяя необходимый диапазон мышью.

3. Перейти во вкладку **Results**.
4. Убедиться, что два флуоресцентных канала активны (кнопки **JOE/HEX** и **FAM** нажаты в поле **Assays Shown** внизу окна программы).
5. В поле **Threshold fluorescence** убедиться, что галочки стоят напротив двух флуоресцентных каналов: JOE/HEX и FAM. Проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысить уровень порога установив уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов. По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, дважды щелкнуть левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне **Graph properties**, для оси Y (**Y axis**) поставить галочку в поле **Scale** напротив пункта **Log**.
6. Результат ПЦР-исследования считается достоверным если, получены правильные результаты для отрицательного (K-) и положительного (K+) контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК (OK) в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями *Ct*, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.
7. Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов. Пробы, в которых появились значения *Ct*, не превышающие значения порогового цикла, указанного во вкладыше, считаются положительными.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Если для пробы в таблице результатов зафиксировано значение порогового цикла, но график флуоресценции по этому каналу не имеет правильной формы с участком характерного экспоненциального подъема флуоресценции (в частности, если график представляет собой прямую линию), этот результат является ошибочным, его нельзя интерпретировать как положительный результат. Такой результат может свидетельствовать о неправильно установленном уровне пороговой линии (или других параметров анализа). Если же он получен при правильном уровне порога (и других параметрах), то необходимо повторить исследование для данной пробы (проб) с этапа экстракции РНК с детекцией в режиме «реального времени» для получения правильного результата.