

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин

«15» января 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «ЛЕЙКИС» для диагностики лейкемии кошек методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «ЛЕЙКИС» предназначена для выявления провирусной ДНК вируса лейкемии кошек в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК вируса лейкемии кошек основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с ДНК **экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-V)**, амплификации полученной ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится амплификация участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК -мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК вируса лейкемии кошек	ДНК ВКО-V

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участка провирусной ДНК вируса лейкемии кошек с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT ЛЕЙКИС	0,3	2 пробирки
ПЦР-буфер-С	0,42	1 пробирка
TaqF-UDG	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК FeLV	0,1	1 пробирка
К-	0,2	1 пробирка
ОКО	1,6	1 пробирка
ВКО-V	0,6	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

Реагенты «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

¹ Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-В».
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

экстракции ДНК.

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

3. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
7. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
8. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ/iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другой рекомендованный Изготовителем.
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
12. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Материалом для исследования служит цельная кровь.

Взятие крови проводится в стерильные пробирки с 3 % раствором ЭДТА из расчета 10:1 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Материал доставляют в лабораторию в день взятия, сохраняя при температуре от 2 до 8°C.

Допускается хранение образцов цельной крови при температуре от 2 до 8 °С – не более 48 часов, замораживание цельной крови не допускается.

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

Образцы цельной крови не требуют предварительной подготовки.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Экстракция ДНК из исследуемого материала при помощи

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «ДНК-сорб-В».

Порядок работы с комплектом реагентов смотрите в инструкции к комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-V**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл.**

Аmplификация и детекция продуктов амплификации

Общий объем реакции - 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Пробирку с **ПЦР-смесью-1-FRT ЛЕЙКИС** разморозить, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения *N* реакций смешать в отдельной пробирке **ПЦР-смесь-1-FRT ЛЕЙКИС**, **ПЦР-буфер-С**, **TaqF-UDG** из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ЛЕЙКИС;**
- **5 мкл ПЦР-буфера-С;**
- **0,5 мкл TaqF-UDG.**

Перемешать **смесь** на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по **15 мкл** в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Необходимо избегать попадания сорбента универсального в реакционную смесь.**

Поставить **контрольные реакции:**

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл К-.**
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *FeLV*.**

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью приборов iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 2.

Интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 2

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК вируса лейкемии кошек	ДНК ВКО-V

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** провирусная ДНК вируса лейкемии кошек, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t , не превышающее 33.

В образце **не обнаружена** провирусная ДНК вируса лейкемии кошек, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM не определено (отсутствует) значение C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение C_t , не превышающее 28.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение C_t превышает 33 по каналу для флуорофора FAM, а по каналу для флуорофора JOE значение C_t не превышает 28. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена специфическая ДНК.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора FAM значение C_t не определено (отсутствует) или превышает 33, и по каналу для флуорофора JOE значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает 28. Необходимо провести повторное ПЦР-

исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 3).

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	≤ 28
K–	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 25	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение *Ct* по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 3, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K–) по каналам для флуорофоров FAM, JOE и/или для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу для флуорофора FAM определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме TaqF -UDG, ПЦР-буфера-С и ПЦР-смеси-1-FRT ЛЕЙКИС. TaqF-UDG, ПЦР-буфер-С и ПЦР-смесь-1-FRT ЛЕЙКИС хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ЛЕЙКИС хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

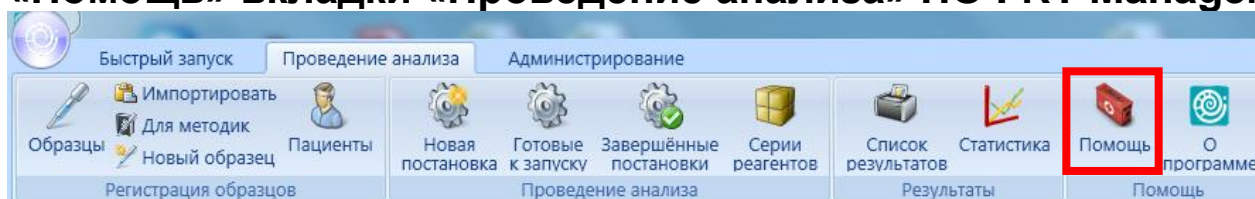
Рекламации на качество тест-системы «ЛЕЙКИС» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru³.

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000, (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

ВНИМАНИЕ! Программирование амплификатора и анализ результатов, полученных в программном обеспечении амплификатора, могут быть выполнены автоматически с помощью Программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия). Для работы следует использовать программу FRT Manager версии 2.0 или выше. **Для ознакомления со всеми возможностями ПО FRT Manager рекомендуем прочитать полное руководство пользователя. Данное руководство располагается в меню «Помощь» вкладки «Проведение анализа» ПО FRT Manager.**



См. также Методические Рекомендации по проведению амплификации и анализу результатов при помощи программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия).

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами 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.

А. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в

дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volum/Объем реакции** - 25 мкл. Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 4

Программа амплификации Leikis

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	–	10
	60	20 с		
	72	10 с		
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	FAM/Green, JOE/Yellow	35
	55	20 с		
	72	10 с	–	

- Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.**. В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before**

1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции. Для канала FAM/Green установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 10FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 15FI. Для канала JOE/Yellow установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

Б. Анализ результатов

Анализ полученных результатов можно проводить вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» или в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager.

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО (канал JOE/Yellow):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала**

видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).

- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.1**.

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

Анализ результатов амплификации специфического участка провирусной ДНК вируса лейкемии кошек (Feline Leukemia Virus) (канал FAM/Green):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная** шкала видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

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

Задать программу амплификации.

Программа амплификации Leikis

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	25с		
	72	25 с		
3	95	10 с	–	35
	55	25 с	FAM, JOE	
	72	25 с	–	

Детекция флуоресценции на 2-м шаге (55 °C) второго блока циклирования.

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке *Users*).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (Leikis.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**.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Запустить выполнение выбранной программы **Leikis** с заданной схемой планшета.

- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from**

- Experimental Plate.** Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **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 эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов.

Накопление продукта амплификации участка ДНК *Feline Leukemia Virus* детектируется по каналу FAM, а накопление продукта амплификации ВКО – по каналу для детекции флуорофора JOE.

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО (канал JOE):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Lybrary** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии.

Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК специфического участка провирусной ДНК вируса лейкемии кошек (*Feline Leukemia Virus*) (канал FAM):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**, отключив кнопку **JOE**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

LOT

Код партии



Использовать до

VER

Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель