

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс[®] *Yersinia enterocolitica* /
pseudotuberculosis-FL»**

Вариант FEP/FRT

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.10	4
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 И ВЫШЕ	7
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА «ДЖИН» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.4I	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	15
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 ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad, США)	19
ПРОВЕДЕНИЕ-АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P (Stratagene, США).....	21
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия).....	23

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica* (оценка вирулентности проводится по генам энтеротоксина (Yst), локуса прикрепления и инвазии (attachment invasion locus - ail) и плазмидному гену адгезина (plasmid pYV adhesin - yadA)) и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Yersinia enterocolitica* / *pseudotuberculosis*-FL» совместно с детекторами конечной флуоресценции:

- трехканальными и четырехканальными детекторами ALA-1/4 (SIA Biosan, Латвия),
 - четырехканальным детектором «Джин» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия),
- а также совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:
- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия),
 - Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия),
 - CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
 - iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
 - Mx3000P (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	
	формат FEP	формат FRT
Канал для флуорофора FAM	FAM/Специфика	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	HEX/ВК	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3
Канал для флуорофора ROX	ROX	ROX/Orange/TxR

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

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.10

Установка параметров теста *Y. enterocolitica* / *pseudotuberculosis*

1. Запустить программу ALA_1 на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста ***Y. enterocolitica* / *pseudotuberculosis***, нажать кнопку **ОК**.
5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (FAM, HEX, ROX), в группе ВКО отметить канал, который используется для внутреннего контроля (FAM).
6. В полях **п-** и **п+** установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каждому каналу для детекции специфической ДНК (см. вкладыш к набору реагентов).
7. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:
Y. pseudotuberculosis = HEX;
Y. enterocolitica = ROX.
8. В поле **Доверительный интервал** установить значение **555 %**.
9. Нажать кнопку **Сохранить**.

Установка параметров теста *Yersinia enterocolitica* type

1. Запустить программу ALA_1 на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста ***Yersinia enterocolitica* type**, нажать кнопку **ОК**.
5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (FAM, HEX, ROX).
6. В полях **п-** и **п+** установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каждому каналу для детекции специфической ДНК (см. вкладыш к набору

реагентов).

7. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:

Ail = FAM;

Yst = HEX;

yadA = ROX.

8. В поле **Доверительный интервал** установить значение **555 %**.
9. Нажать кнопку **Сохранить**.

Измерение флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и запустить программу ALA_1 на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Для этого в главном меню выбрать **Протокол** → **Создать новый** или **Открыть**, чтобы открыть созданный ранее протокол.
3. В окне протокола необходимо выбрать тип используемого ротора (**36 x 0,5** или **48 x 0,2**), ввести номер протокола, выбрать нужный тест (***Y. enterocolitica* / *pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica* type**) в меню-вкладке **Тест** и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке **Образец**).
4. Обозначить образцы, которые являются фоновыми для данной группы образцов, как **ФОН** (используя сочетание клавиш **Ctrl+F**). В качестве образцов, обозначенных **ФОН** использовать пробирки с образцами ФОН.
5. Закрыть окно редактирования протокола, нажав на кнопку **Exit** в верхнем левом углу панели. Протокол сохранить.
6. Поставить пробирки в ячейки ротора в соответствии с заданной последовательностью и запустить детекцию, выбрав в меню **Протокол** → **Детекция** или значок **Детекция по протоколу** на панели инструментов (вверху экрана). По окончании измерения на экран будет выведена таблица результатов.

Интерпретация результатов

1. Полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы ALA_1. Результаты в таблице представляются с помощью следующих обозначений:

обнаружено – положительный результат;

не обнаружено – отрицательный результат;

сомнительно – результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в, так называемой, «серой зоне»);

нд – недостоверный результат (в образце не детектируется – не превышает заданного порогового значения – ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).

2. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию и вкладыш к набору реагентов).
3. Интерпретация результатов тестирования исследуемых образцов проводить в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
4. Образцы, для которых получен результат **нд** (кроме К–), требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции ДНК из исследуемого материала. Для образца К– результат **нд** является нормой.
5. Образцы, для которых получен результат **сомнительно**, требуют повторного проведения анализа, начиная с этапа экстракции ДНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными.
6. Если результаты контрольных образцов не соответствуют указанным значениям, требуется предпринять меры, указанные в инструкции к набору реагентов.

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 И ВЫШЕ



1. Включить прибор и запустить программу ALA_1 на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Тест для обнаружения *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* может быть предустановлен в программе ALA_1.
3. Проверить наличие теста **Yersinia** в списке настроенных тестов можно, выбрав в основном меню программы **Настройка** → **Настройка тестов**. В появившемся окне **Окно настройки тестов** в таблице **Список тестов** найти тест **Yersinia**.
4. Если тест **Yersinia** не был предустановлен в программе ALA_1, то для проведения детекции и интерпретации результатов необходимо создать новый тест или импортировать его через архивный файл в список тестов, используемых на программе ALA_1.

ВНИМАНИЕ! Импорт или создание новых тестов в программе ALA_1 возможно только для пользователей с правами администратора.

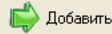


Импортировать новый тест

Импорт новых тестов в программе ALA_1 осуществляется через выбор основного меню **Настройка** → **Импорт тестов**. Далее выбрать архивный файл в формате *.zip и импортировать его в программу.


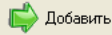

Создать новый тест

- Выбрать в основном меню программы **Настройка** → **Настройка тестов**. В появившемся окне **Окно настройки тестов** добавить название нового теста **Yersinia** кнопкой  **Добавить** в таблице **Список тестов**.
- В поле **Реакционная смесь** задать название реакционных смесей: **Y. enterocolitica / pseudotuberculosis, Y. enterocolitica type**.
- Для реакционной смеси **Y. enterocolitica / pseudotuberculosis** в поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: FAM, HEX и ROX. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал **FAM** и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу: **ВКО**, установить значение порога – **3,0**. Далее для канала **HEX** задать обозначения по этому каналу: **Y. pseudo**, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно; для канала **ROX**

задать обозначения: *Y. entero*, в поле порога для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. В поле **Введите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.


- Для реакционной смеси *Y. enterocolitica* type в поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: FAM, HEX и ROX. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал **FAM** и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу – **Ail**, в поле пороги для «+» и «-» установить **3,0** и **2,5**, соответственно. Далее для канала **HEX** задать обозначения по этому каналу **Yst**, в поле пороги для «+» и «-» задать **3,0** и **2,5**, соответственно. Для канала **ROX** – обозначения **yadA**, в поле пороги для «+» и «-» задать **3,0** и **2,5**, соответственно. В поле **Введите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.
- Отметить контроли, использующиеся в этом тесте: **ОКО** (отрицательный контроль выделения), **К+** (положительный контроль амплификации), **К-** (отрицательный контроль амплификации). Выбрать алгоритмы интерпретации для контролей по умолчанию.
- В поле **Таблица интерпретации результатов** нажать кнопку  **Создать**. Программой ALA_1 будет автоматически создана таблица возможных вариантов сочетаний результатов детекции для всех реакционных смесей для всех каналов и итоговый результат для каждого из этих вариантов. Продолжением этой таблицы являются возможные варианты сочетаний результатов контролей. Результаты детекции клинических образцов и контролей будут выдаваться после измерения в соответствии с этой таблицей. Сохранение теста и закрытие окна осуществляется кнопкой  **OK**.


5. Создать протокол измерения.

- В основном окне программы нажать кнопку  **Новый протокол**. В появившемся окне **Окно настройки протокола** выбрать тест *Yersinia* из списка доступных тестов и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный тест появится в списке **Тесты протокола**.
- В поле **Количество образцов** задать количество исследуемых образцов без контрольных образцов и образцов **ФОН**, нажать кнопку  **Добавить**. В поле **Количество фоновых пробирок** выбрать их необходимое количество для

каждой реакционной смеси.

- В **Таблице имен образцов, фоновых пробирок и контролей** задать имена образцов, добавить необходимое количество контролей. В поле **Тип ротора** выбрать ротор, который будет использоваться в данном протоколе.

Сохранение протокола и закрытие окна осуществляется кнопкой  **ОК**.

6. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора ALA_1 в соответствии с заданной последовательностью. Запустить измерение, нажав на кнопку  **Измерить** в панели активных кнопок (вверху экрана).

Интерпретация результатов

1. Результат измерения выдается программой после завершения измерения протокола в окне **Окно результатов**. Полученные данные интерпретируются программой автоматически в соответствии с **Таблицей интерпретации результатов**:

ОБНАРУЖЕНО (*Y.pseudo*) указывается для образцов, в которых обнаружена ДНК *Yersinia pseudotuberculosis*, аналогично для *Yersinia enterocolitica* и ДНК генов *Ail*, *Yst*, *yadA*;

не обнаружено указывается для образцов, в которых не обнаружена ДНК *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*.

невалидный указывается для образцов, у которых не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО. Для таких образцов требуется повторное проведение анализа.

сомнительный указывается для образцов, у которых сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов. Для таких образцов требуется повторное проведение анализа.

2. Интерпретация результатов тестирования исследуемых образцов проводится в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.
3. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию и вкладыш к набору реагентов).

ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА «ДЖИН» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.4I

Проводится согласно описанию в паспорте «Детектор полимеразной цепной реакции флуоресцентный Джин».

Для детекции и интерпретации результатов используются настройки, указанные во вкладыше к набору реагентов.

Настройки теста можно установить, выбрав меню *Настройки, Список тестов* в главном меню программы, и если значения изменены, требуется восстановить начальные значения, указанные во вкладыше к набору реагентов.

1. Включить прибор и запустить программу **Gene** на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Ввести количество измеряемых образцов и количество фоновых пробирок (**2**), выбрать нужный тест (***Y. enterocolitica / pseudotuberculosis, Y. enterocolitica type***) в графе **Тест**, нажать кнопку **ОК** (кнопкой мыши) и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке **Образец**).
3. В качестве образцов, обозначенных **ФОН**, использовать пробирки с образцами ФОН.
4. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «Джин» в соответствии с заданной последовательностью (сначала первые 12 образцов) и запустить детекцию, нажав кнопку, обозначенную значком цветной призмы, в панели активных кнопок (вверху экрана). По окончании детекции первой группы заменить пробирки и продолжить измерения, нажав кнопку **ОК**. По окончании детекции вынуть пробирки и нажать кнопку **ОК**.

Интерпретация результатов

1. Для «Джин» четырехканального полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы Gene (колонка **Результат** на экране):
 - знаком «+» (на красном фоне) обозначаются положительные образцы;
 - знаком «-» (на зеленом фоне) – отрицательные образцы;
 - знаком «?» (на желтом фоне) обозначается результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для

- отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»);
- **нд** (на оранжевом фоне) обозначается недостоверный результат (в образце не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).
2. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию и вкладыш к набору реагентов).
 3. Интерпретация результатов исследования исследованных образцов проводится в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с 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.

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 пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или пробирок объемом 0,1 мл.

Программирование амплификатора

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

ВНИМАНИЕ! Лунка №1 обязательно должна быть заполнена исследуемой пробиркой. При одновременной загрузке в ротор пробирок с несколькими типами реакционных смесей в первые две ячейки должны быть помещены пробирки с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type.**

3. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
4. Выбрать объем реакционной смеси и тип ротора:
Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл, Rotor type – 36-Well Rotor/36-луночный ротор или **72-Well Rotor/72-луночный ротор**, в зависимости от используемого ротора.
5. Задать программу амплификации для приборов роторного типа (см. инструкцию к набору реагентов) для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля.**

Программа амплификации для приборов роторного типа²

Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

6. Задать параметры калибрования (активировать **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** в мастере нового эксперимента):

- осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (активировать **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-МЫХ**);
- осуществлять калибрование перед первым измерением (активировать **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**);
- установить калибровки каналов для всех флуорофоров от 5 FI до 10 FI (активировать **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

7. Запустить программу амплификации, активировав **Start Run/Старт**, и присвоить название эксперименту.

8. В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение исследуемых образцов, отрицательного контроля экстракции, положительного и отрицательного контролей амплификации ДНК.

Для этого необходимо внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Положительный контроль ПЦР обозначить как **K+**, отрицательный – как **K-**. Напротив всех исследуемых образцов установить тип **Unknown/Образец**, напротив положительных контролей – тип **Positive control/Положительный контроль**, для отрицательного контроля экстракции – тип **Negative control/Отрицательный контроль**, для отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC/ОТР. (ПФ)**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам,

² Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q.

установить тип **None/Пусто**.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Интерпретация результатов амплификации для каждого типа реакционных смесей при их одновременной загрузке в ротор проводится отдельно.

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать, Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать** или **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии для каждого из основных открывшихся окон (FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange) **Threshold/Порог**.
3. В меню каждого основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон, Slope Correct/Коррект.уклона** и установить значение **More settings/Удаление выбросов – 10 %**.
4. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0.05**.
5. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, К+, К– в соответствии с пороговыми значениями *Ct*, указанными во вкладыше к набору реагентов.
6. Интерпретация результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и пороговыми значениями *Ct*, указанными во вкладыше.

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 ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)

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

Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
2. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл.

Программа амплификации для приборов планшетного типа³

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

ВНИМАНИЕ! Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. ниже). Нажать **OK**.

1	95,0 C for 15:00
→ 2	95,0 C for 0:10
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3	60,0 C for 0:25
	+ Plate Read
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	72,0 C for 0:10
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
← 5	GOTO 2, 44 more times
	END

³ Например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96».

3. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
4. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar 705** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
5. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
6. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

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

7. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Использование готового шаблона для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;
- в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Plate** выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения

прибора CFX96. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе таблицы результатов.

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.

Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. Чтобы выделить график образца «K+» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

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

Интерпретация результатов

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

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

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора iQ5 рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с куполообразной крышкой (например, Ахуген, США).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор и оптический модуль за 20-30 мин до проведения реакции.
2. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
3. Задать программу амплификации (**Protocol**).

Программа амплификации для приборов планшетного типа⁴

Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Дать название новому протоколу и сохранить его.

4. Задать расположение проб на платформе (**Plate**), выбрать флуорофоры (**Select/add fluorophores**) FAM, JOE/HEX, ROX, активировать флуорофоры для проб в созданном протоколе с помощью клавиши **Fluorophore loading in Whole Plate mode**, выбрать **Sample Volume – 25 мкл**, **Seal Type – Domed Cap**, **Vessel Type – Tubes**, затем сохранить созданный протокол **Save/Exit Plate Editing**.
5. После этого внести реактивы для амплификации и ДНК-пробы в пробирки и поставить их в прибор.
6. Запустить прибор (**Run**), выбрать **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Анализ результатов проводится по каналам FAM, JOE/HEX и ROX.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Data Analysis**.
3. Выбрать **Base line в Crossing Threshold User Defined** в диапазоне 20 – 25. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать

⁴ Например, iCycler, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96».

кривые другой формы. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.

4. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, К+, К– (см. инструкцию и вкладыш к набору реагентов).
5. В отрицательном контроле экстракции (ОК) не должно быть каких-либо значений *Ct* (за исключением результата по каналу FAM при использовании ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica* / *Y.pseudotuberculosis*).
6. Интерпретация результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и пороговыми значениями *Ct*, указанными во вкладыше 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 Mx3000P (Stratagene, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора Mx3000P рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок для ПЦР на 0,2 мл с куполообразной крышкой (например, Ахуген, США).

1. Включить прибор и запустить программу **Stratagene Mx3000P**.
2. В окне **New Experiment Options** выбрать 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**.
5. 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**. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры **FAM, JOE** и **ROX**.
6. В окне **Well Information** (появляется при двойном щелчке по каждой ячейке) внести имя для каждого исследуемого образца
7. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации для приборов планшетного типа (см. инструкцию к набору реагентов). Для этого следует использовать один из следующих способов:
 - а) Нажать кнопку **Import...** Перейти в папку, содержащую предшествующий экспериментальный файл и открыть его. В окне **Thermal Profile** появится необходимый профиль термоциклирования.
 - б) В меню **Thermal Profile Setup** задать соответствующую программу амплификации

Программа амплификации для приборов планшетного типа⁵

Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

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.

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

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Перейти в раздел **Analysis**, выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
- На открывшейся вкладке **Analysis Selection/Setup** убедиться, что все исследуемые образцы активны (ячейки соответствующие образцам должны иметь другой оттенок).
- Перейти на вкладку **Results**.
- Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога. Для этого в нижней панели **Dyes shown** активировать отображение каждого флуоресцентного канала в отдельности, просмотреть положение линии порога, и, при необходимости, изменить.
- Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, К+, К– (см. инструкцию и вкладыш к набору реагентов).
- Интерпретация результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и пороговыми значениями *Ct*, указанными во вкладыше к набору реагентов.

⁵ Например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96».

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

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При использовании прибора «ДТ-96» рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок для ПЦР на 0,2 мл с куполообразной крышкой (например, Axugen, США).

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 – **Yersinia** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – качественный.
 - **Метод** – пороговый (Ct).
 - **Пробирки** – образец, контроль +, контроль –.
 - **Контроли**: положительный (K+) – 2, отрицательный (K-) – 2.
 - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл.
 - **Флуорофоры**: Fam – специфика; Hex (для версии программы v.7.3.2.2 выбрать R6G) – специфика, Rox – специфика.
 - Задать программу амплификации для приборов планшетного типа и нажать **ОК**.

Программа амплификации для приборов планшетного типа⁶

Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

4. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название **Yersinia**, указать количество образцов и нажать **ОК**
5. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** появившейся таблицы. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора.

⁶ Например, iCycler iQ, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96».

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! 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.

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 %**,
- **Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования**
- **Критерии достоверности результата:** поставить галочку, нижняя граница/порог положительного результата – 5 %, верхняя граница/порог нормализации данных – 30 %.
- **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).

Нажать кнопку **Применить**.

5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки Ф (отжать кнопку).**

6. 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.

7. Значения *Ct* для исследуемых образцов подлежат интерпретации, если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, К+, К– (см. инструкцию и вкладыш к набору реагентов)

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