

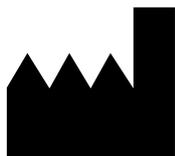
# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов  
для обнаружения ДНК микобактерий  
туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*)  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс<sup>®</sup> МТС-FL»**

**Формат FRT**

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Центральный научно-исследовательский  
институт эпидемиологии»,  
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 GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) .....	4
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 SmartCycler (Cepheid, США) .....	13
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) .....	15
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Mx3000P/Mx3005P (Stratagene, США) .....	19
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) .....	22

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов «АмплиСенс® *MTC-FL*» формат FRT для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex (MTC)*, в разных видах клинического материала, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) совместно с приборами для ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- SmartCyclerII (Cepheid, США);
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

### Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов <sup>1</sup>
канал для флуорофора FAM	FAM/Green
канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3

<sup>1</sup> В каждом разделе методических рекомендаций названия каналов детекции даны в соответствии с описываемым прибором.

## **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. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

### **Программирование амплификатора:**

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки или стрипы 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.

**ВНИМАНИЕ!** Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (не пустой). Если в один ротор загружаются пробирки с реагентами от разных наборов реагентов, то в первую лунку должна попасть пробирка с наибольшим количеством флуорофоров. Например, при одновременной загрузке в ротор пробирок с тестами на обнаружение *Mycobacterium tuberculosis complex*, его количественное определение или дифференцирование, в первую лунку следует поместить пробирки с реагентами для количественного определения или дифференцирования *Mycobacterium tuberculosis complex*.

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

### **Создание шаблона для проведения теста**

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.

2. Во вкладке выбрать шаблон **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл** для редактирования и нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes /Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

**Программа амплификации «95-65-72 МТС»**

<b>Цикл</b>	<b>Температура, °C</b>	<b>Время</b>	<b>Измерение флуоресценции</b>	<b>Количество циклов</b>
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	15 с	–	5
	65	30 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

6. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
7. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне:
  - а) для оптимизации измерения сигнала по выбранным каналам установить калибровку от **5FI** до **10FI** для всех каналов FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red.  
Для этого нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-МЫХ**, в открывшемся для первого канала окне (**Auto Gain Optimisation Channel Settings/Auto Gain Calibration Channel Settings/Установки Авто-оптимизации уровня сигнала**) указать в строке **Target Sample Range/Нужный диапазон стартового сигнала** значения минимального и максимального сигнала, нажать кнопку **OK**. Автоматически откроется окно для следующего канала. Проверить выбранные для всех каналов значения можно в графах **Min Reading/Миним. Сигнал, Max Reading/Максим. Сигнал**.

8. Нажать кнопку **Next/Далее**. Для сохранения запрограммированного шаблона, необходимо, нажав кнопку **Save Template/Сохр.шаблон**, задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе амплификации.

### Использование готового шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. В открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**, затем в списке шаблонов выбрать шаблон, запрограммированный согласно описанию в разделе **Создание шаблона**.
2. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes/Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**
3. В открывшемся окне, проверить, что указан объем реакционной смеси **Reaction volume/Объем реакции**, равный **25** мкл, и напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска** установлена галочка, активирующая эту опцию. Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В следующем окне можно проверить правильность программ амплификации и детекции и условий автооптимизации уровня сигнала, заданных в шаблоне. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. При этом ротор с образцами должен быть уже закреплен и крышка прибора закрыта. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
5. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «K-», положительный – «K+». Напротив всех исследуемых биологических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**. Нажать кнопку **Finish/OK/Закончить**.

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

Примечание – Для редактирования таблицы образцов до старта нужно, чтобы предварительно в меню **File/Файл** подменю **User preferences/Предпочтения** был выбран пункт **Edit Samples Before Run Started/Редактировать образцы перед стартом теста**.

**Анализ результатов:**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene. 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 *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

**Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green:**

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/ Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
4. В меню 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 = 0.03**.
6. Выбрать параметр **More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб равным (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В таблице результатов (окно **Quantitation Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.
8. Анализ результатов по каналу JOE/Yellow провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Канал	<b>Threshold/Порог</b>	<b>Dynamic tube/ Динамич.фон</b>	<b>Slope Correct/ Коррект. уклона</b>	<b>More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов</b>
FAM/Green	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,05	включена	выключена	15%

**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.

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

## 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

### Программирование амплификатора

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

2. Запустить программу iCycler iQ5.

3. Поместить пробирки, стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя 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 пробирки (стрипы) при установке в прибор.

### Создание шаблона для проведения теста.

1. Задать схему планшета (расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала в исследуемых образцах):

- Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета 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-490** и **JOE-530**. 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 файл **Plate Setup** (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.**

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading** и задать схему планшета, используя кнопки верхней панели. Указать имя проб в столбце **Identifier/Condition** в появившейся строке в нижней части экрана. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5. Нажать кнопку **Select/Add Fluorophores** и в открывшемся окне выбрать флуорофор, отметив его в графе **Selected** галочкой. Нажать **OK**. В окне **Fluorophore** появится название канала. Чтобы добавить измерение флуоресцентного сигнала к каждой пробе, необходимо нажать на флуорофор, чтобы он был активен, и, используя кнопку **Fluorophore loading in whole Plate mode**  над схемой, выделить пробы на планшете. 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**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.
- 2. Все биологические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-».
- 3. Задать программу амплификации. Для этого в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

**Программа амплификации «95-65-72 МТС»**

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	5
	65	30 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

- 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**.

- 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 **Use Persistent Well Factors** (предлагается по умолчанию). Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- После окончания программы необходимо закрыть программу и выключить прибор (амплификатор и блок оптической системы).

### **Использование готового шаблонного файла 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 модуле в **Workshop** выбрать в верхнем левом окне необходимый файл постановки;
- в блоке **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и отредактировать схему планшета (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **SampleFiles**);

в блоке **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и проверить правильность выбранного протокола (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).

### **Анализ результатов:**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения приборов iCycler iQ / iCycler iQ5. 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 *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

1. Запустить программу, выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**:
- Для прибора **iCycler iQ** выбрать значок анализируемого канала в окне **Select a Report**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Задать уровень пороговой линии

- ввести в текстовом поле **Threshold Position** значение **30** для канала **FAM-490** и **45** для канала **JOE-530**. Нажать кнопку **PCR Quant**. В таблице результатов **Quant Results** появятся значения *Ct* для анализируемого канала.
- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по анализируемому каналу. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Задать уровень пороговой линии на уровне, соответствующем 10 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ПКО ДНК *MTC/STI* в последнем цикле амплификации для всех каналов. Уровень флуоресценции образца считают равным ближайшему большему делению шкалы, помеченному цифрой. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для образца ПКО ДНК *MTC/STI* имел характерный сигмообразный вид. Можно использовать автоматически выбираемый уровень пороговой линии (по умолчанию), если он попадает в указанный диапазон. Чтобы выделить график образца можно воспользоваться кнопкой **Display Wells**, либо установить курсор на графике этого образца и сделать двойной щелчок. Чтобы изменить уровень пороговой линии нужно либо перетащить его с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать меню **Baseline Threshold** (в ниспадающем меню, вызываемом щелчком правой кнопки мыши по окну графиков флуоресценции), затем выбрать опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле **Threshold Position**. Для выведения на экран таблицы результатов, нажать кнопку **Results**.

### **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.

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

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА SmartCycler (Cepheid, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование одноразовых полипропиленовых пробирок на 0,025 мл (CERHEID, США).

1. Перед постановкой в амплификатор необходимо опустить реакционную смесь в нижнюю термоциклируемую часть пробирки. Для этого нужно поместить пробирки в ротор специальной центрифуги Mini-Spin (фирмы Cepheid, США) и включить ее на 5-7 с.
2. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышки ячеек.

### Программирование амплификатора

1. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышки ячеек.

**ВНИМАНИЕ!** Перед постановкой пробирок в прибор, необходимо осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, используя миницентрифугу к прибору Smart Cycler II.

2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.
3. В основном меню программы выбрать **Define Protocols**. В открывшемся окне выбрать в нижнем левом углу экрана кнопку **New Protocol**, дать название протоколу **95-65-72 МТС** и запрограммировать прибор для выполнения программы амплификации:

#### Программа амплификации «95-65-72 МТС» для прибора SmartCycler II (Cepheid, США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	45
	65	50 с	Optics ON	
	72	20 с	–	

4. В нижней части окна нажать кнопку **Save Protocol**.
5. Нажать кнопку **Create Run** в основном меню программы. В левой центральной части экрана нажать кнопку **Dye set** и выбрать комбинацию красок **FCTC25**.
6. В центре экрана нажать кнопку **Add/Remove Sites** и в появившемся окне выбрать нужный протокол (программу) и сайты, в которых проводится анализ. Нажать кнопку **OK**.

7. Запустить выполнение программы эксперимента кнопкой в нижней части экрана **Start Run**. В появившемся диалоговом окне нужно ввести имя файла, в котором будут сохранены все данные эксперимента.
8. В таблице в верхней половине окна перечислены установки анализа данного эксперимента. В этой таблице для каждого образца в столбце **Sample Type** по умолчанию указан тип образца **UNKN** (неизвестный). В колонке **Sample ID** дается название каждому образцу.

### **Обработка и анализ данных**

1. Выбрать в меню **Analysis settings**. Задать уровень расчета пороговой линии равный 30 для каналов **FAM** и **Cy3**.
2. В таблице результатов (окно **Results Table**) для каждой пробы появятся значения **Ct** по каналам **FAM** и **Cy3**.

Результаты можно интерпретировать, пользуясь автоматической интерпретацией, отраженной в таблице результатов (**Results**) и визуально, просматривая графики кривых флуоресценции по каналам **FAM** и **Cy3**.

### **Интерпретация результатов**

1. Если в таблице результатов в графе Std/Res FAM указан результат POS (кривая флуоресценции для данного образца на графике данных по каналу FAM пересекает пороговую линию ( $Ct_{FAM} \neq 0$ ), при этом в графе Std/Res Cy3 указан результат POS ( $Ct_{Cy3} \neq 0$ ) или NEG ( $Ct_{Cy3} = 0$ ) – образец считается положительным, *Mycobacterium tuberculosis complex* **обнаружена**.
2. Если в таблице результатов в графе Std/Res FAM указан результат NEG (кривая флуоресценции для данного образца на графике данных по каналу FAM не пересекает пороговую линию ( $Ct_{FAM} = 0$ ), при этом в графе Std/Res Cy3 указан результат POS ( $Ct_{Cy3} \neq 0$ ) – образец считается отрицательным, *Mycobacterium tuberculosis complex* **не обнаружена**.
3. Если в таблице результатов в графах Std/Res FAM и Std/Res Cy3 указаны результаты NEG ( $Ct_{FAM} = 0$  и  $Ct_{Cy3} = 0$ ), требуется повторная амплификация этого образца, в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Если валидный результат не получен, то образец обозначается как **невалидный** и рекомендуется повторное взятие и исследование материала.

## ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ 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).

### Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и запустить программу RealTime\_PCR v.7.3 и выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. 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**.

### Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** выбрать команду **Создать новый тест**, ввести название нового теста «**95-65-72 МТС**» – и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
  - **Тип – качественный**
  - **Метод – пороговый (Ct)**
  - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль +, контроль –**
  - **Контроли: положительный (K+) – 1, отрицательный (K–) – 1.**
  - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл
  - **Флуорофоры: Fam** – Специфика, **Hex** – ВКО.
  - Задать программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

## Программа амплификации «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	5
	65	30 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	15 с	–	40
	65	30 с	Fam, Hex, Rox, Cy5	
	72	15 с	–	

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**95-65-72 МТС**», указать количество образцов, нажать **ОК**.
4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси – 30 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
6. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

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

7. Последовательно нажать кнопки **Заккрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

#### Использование готового шаблонного файла для проведения теста

Для запуска прибора можно также использовать ранее созданный шаблон теста с заданными параметрами амплификации и заданным количеством контролей. Для этого:

- во вкладке **Протокол** нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**95-65-72 МТС**», указать количество образцов, нажать **ОК**;
- присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку

напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**;

в меню **Запуск программы амплификации** проверить правильность выбранной программы амплификации и объема реакционной смеси, заданных в шаблоне теста.

### **Анализ результатов:**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». 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. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Качественный**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить
  - **Критерий положительного результата ПЦР – 60%**.
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 противном случае необходимо повысить уровень порога. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log\_Y** (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%** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
6. Для дальнейшей работы с данными можно скопировать результаты значений  $C_t$  для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета в виде файла Word нажать кнопку **Отчет по результатам анализа** . Далее выбрать галочками параметры, необходимые для отображения в отчете, нажать кнопку затем

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

#### **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.

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

## ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ 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 и запустить программу Stratagene Mx3000P.
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 напротив пункта **FAM filter set** установить параметр FAM, напротив **HEX/JOE filter set** – JOE.
5. В меню **Plate Setup** задать параметры измерения флуоресценции. Для этого выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые или стрипы и обозначить все выделенные ячейки как **Unknown** в окне **Well type**. Для опции **Collect fluorescence data** отметить флуорофоры FAM, JOE.
6. Открыть окно **Well Information** с помощью двойного щелчка левой кнопкой мышки по ячейке с исследуемым образцом. Внести имя для каждого образца.
7. На вкладке **Thermal Profile Setup** задать программу амплификации:

### Программа амплификации «95-65-72 МТС» для приборов планшетного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	5
	65	30 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

8. В меню выбрать команду **Run**. Проверить правильность заданной программы амплификации. Нажать кнопку **Start**. Поставить галочку в окошке **Turn lamp off at end of run**. Сохранить эксперимент.

**Анализ результатов:**

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

**Интерпретация результатов**

В случае получения:

1. Положительного результата по каналу FAM ( $C_t$  не превышает граничное значение, указанное во вкладыше) и положительного ( $C_t$  не превышает граничное значение, указанное во вкладыше) или отрицательного ( $C_t$  превышает граничное значение, указанное во вкладыше) результата по каналу JOE/HEX – результат валидный – *Mycobacterium tuberculosis complex* **обнаружена**.
2. Отрицательного результата по каналу FAM и положительного по каналу JOE/HEX ( $C_t$  не превышает граничное значение, указанное во вкладыше) – результат валидный – *Mycobacterium tuberculosis complex* **не обнаружена**.
3. Отрицательного результата или значения  $C_t$ , превышающего граничное значение, указанное во вкладыше, по каналам FAM и JOE/HEX результат считается невалидным. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Если валидный результат не получен, то образец обозначается как **невалидный** и рекомендуется повторное взятие и исследование материала.
4. Значения  $C_t$ , превышающего граничное значение, указанное во вкладыше по каналу FAM, и положительного – по каналу JOE/HEX ( $C_t$  не превышает граничное значение, указанное во вкладыше) – результат **невалидный**. Требуется

повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как **сомнительный** и рекомендуется повторное взятие и исследование материала.

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

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

### 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 **Create a new Run** (или в меню **File/Experiment** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**).
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 «95-65-72 МТС»

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	5
	65	30 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	15 с	–	40
	65	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

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

1	95,0 C for 15:00
→ 2	95,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3	65,0 C for 0:30
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	72,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5	GOTO 2 , 4 more times
→ 6	95,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
7	65,0 C for 0:30
	+ Plate Read
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
8	72,0 C for 0:15
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
9	GOTO 6 , 39 more times
	END

- Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
  - Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав на кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры FAM, HEX, ROX, Cy5 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 в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
  - Сохранить схему планшета, выбрав **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.
  - 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.
- 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 данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96 / CFX96 Touch. 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.

### Вариант 1.

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

### Вариант 2.

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

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

окне название образцов.

Для формирования отчета о постановке необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.

### **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.

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