

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов  
для выявления и количественного определения ДНК  
*Pseudomonas aeruginosa* в клиническом материале  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)  
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс<sup>®</sup> *Pseudomonas*  
*aeruginosa*-скрин-титр-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) .....	7
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).....	11

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в клиническом материале (кровь, плазма крови, мазок из ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), мокрота, эндотрахеальный аспират, моча, секрет простаты, спинномозговая жидкость (СМЖ), пунктаты из очагов поражения органов и тканей) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Pseudomonas aeruginosa*-скрин-титр-FL» 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),
- iCycler iQ, iQ5 (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> Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

## ПОРЯДОК РАБОТЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NucliSENS easyMAG, (bioMérieux, Франция)

**Вариант 1.** Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора.

Данный метод экстракции позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции ДНК (**Plasma**), объем **образца (Volume) – 0,1 ml**, объем элюции (**Eluate) – 55 mkl**, тип образца (**Type) – Lysed**, очередность экстракции ДНК в образцах (**Priority) – Normal**.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing-No, On-board Lysis Incubation-No**.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-87**. Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

**ВНИМАНИЕ!** При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объёмом 1,5 мл. После окончания инкубации (**пункт 8**) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG.

6. В пробирки с **буфером для лизиса NucliSens** и **ВКО STI-87**, внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с фильтром и тщательно перемешать пипетированием. Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК Ps.aerug**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.

9. Ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром по **10 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов вне прибора (**Off board**).
11. После окончания экстракции ДНК извлечь пробирки из прибора. Пробирки с ДНК-пробами перенести в зону проведения ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации.

**Вариант 2.** Экстракция ДНК с лизисом образца в приборе.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции ДНК – плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – **0,1-1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность экстракции ДНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит автоматически в приборе: **On-board Lysis Buffer Dispensing-Yes, On-board Lysis Incubation-Yes**.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В каждую пробирку, предназначенную для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **100 мкл** подготовленных проб отдельным наконечником с фильтром.
6. Для отрицательного контроля (В-) в пробирку, предназначенную для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК P.aeruginosa**.
7. В отдельной стерильной пробирке на 2 мл смешать **магнитную силику NucliSens** и **ВКО STI-87** стерильными наконечниками с фильтром в следующем соотношении:

Количество образцов для экстракции ДНК	Количество магнитной силики NucliSens, мкл	Количество ВКО STI-87, мкл
<b>1</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>24</b> (полная загрузка прибора)	<b>250</b> (с запасом на 1 пробу)	<b>250</b>

8. Содержимое пробирки тщательно перемешать. Смесь магнитной силики NucliSens с ВКО STI-87 может храниться не более 30 мин.
9. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов в приборе (**On board**).
10. Дождаться, пока прибор NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State – Idle** (примерно 15 мин).
11. Тщательно перемешать пробирку с приготовленной смесью магнитной силики NucliSens и ВКО STI-87 на вортексе до однородного состояния.
12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **20 мкл приготовленной смеси**. Каждую пробирку тщательно перемешать пипетированием с помощью многоканального дозатора отдельными наконечниками с фильтром на 200 мкл.
12. Запустить на приборе программу продолжения экстракции ДНК.
13. После окончания экстракции ДНК извлечь пробирки из прибора. Пробирки с пробами ДНК перенести в зону проведения ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации.

## **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 прибором Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

**Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.**

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. При работе с прибором Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 рекомендуется использование прозрачных ПЦР-пробирок на 0,2 мл с плоской крышкой (детекция через дно пробирки) или пробирок на 0,1 мл.

Поместить пробирки в ротор амплификатора Rotor-Gene 3000/6000/Q так, что бы первая пробирка попала в лунку 1; установить ротор в прибор, закрыть крышку (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

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

### **Программирование амплификатора:**

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **Advanced/Детальный мастер** и выделить **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**), и отметить, что вы не используете пробирки с выпуклыми крышками (Rotor-Gene 3000)/закреплено фиксирующее кольцо (Rotor-Gene 6000). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**. Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. Нажать кнопку

**Next/Далее.**

5. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать соответствующие параметры.

**Программа «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа<sup>2</sup>**

<b>Цикл</b>	<b>Температура, °C</b>	<b>Время</b>	<b>Измерение флуоресценции</b>	<b>Кол-во циклов</b>
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	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..**
- а) осуществлять калибровку по каналам FAM/Green и JOE/Yellow (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
- б) для установки калибровки всех каналов нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал – 5, Max Reading/Максим. Сигнал – 10**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.
8. Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
9. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
10. Внести данные в таблицу образцов (*открывается автоматически после запуска амплификации*). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых клинических образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как **K–**, положительный контроль экстракции – **ПК**. Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, напротив положительного контроля экстракции – тип **Positive control/Положительный контроль**, напротив отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC**. Для калибраторов – тип **Standard/Стандарт** и указать их концентрации в столбце **Given Conc.** Значения

<sup>2</sup> Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или аналогичные.



концентраций калибраторов указаны во вкладыше к набору реагентов. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

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

### **Анализ результатов**

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

#### **Анализ результатов амплификации ВКО STI-87 (канал FAM/Green):**

1. Проверьте, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.
4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **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 (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В отрицательном контроле ПЦР (К-) – **ДНК-буфер** – отсутствуют значения **Ct**.
8. В ДНК-калибраторах должны появиться значения **Ct** и значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**).

#### **Анализ результатов реакции амплификации ДНК Pseudomonas aeruginosa (канал JOE/Yellow):**

1. Проверьте, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации.
2. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
3. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии **Threshold/Порог**.

4. В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон**, **Slope Correct/Коррект.уклона**.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (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 (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
7. В отрицательном контроле экстракции (В-) – **ОКО** – значение должно быть не более 5 копий ДНК/проба.
8. В отрицательном контроле ПЦР (К-) – **ДНК-буфер** – отсутствуют значения *Ct*.
9. В ДНК-калибраторах должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**).
10. В положительном контроле экстракции (ПК) – **ПКО ДНК P.aeruginosa** – должно появиться значение *Ct* и значение концентрации.

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

1. Включить прибор, открыть программу *iCycler/iQ5*.

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

2. Поместить микропробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор.

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

### Программирование амплификатора (осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора):

1. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.
2. В открывшемся окне задать соответствующие параметры амплификации.

#### Программа «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа<sup>3</sup>

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новую плашку образцов (**Plate Setup**). Задать схему расположения пробирок в планшете.
5. В открывшемся окне все клинические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «–». Калибраторы по каналу **JOE/HEX** и **FAM** задать как **Standard** и указать концентрацию из вкладыша к набору реагентов. При задании калибраторов кнопка **Whole Plate Loading** должна быть не активирована. Для всех образцов и калибраторов задать измерение флуоресценции по двум каналам **JOE/HEX** и **FAM**.

<sup>3</sup> Например, iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США) или аналогичные.

6. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
7. Нажать кнопку **Run**. В открывшемся окне отметить **Use Persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** и сохранить эксперимент.

### **Обработка данных**

1. Запустить программу и открыть сохраненный файл. Для этого в модуле **Workshop** нажать **Data file** и выбрать файл данных. Перейти в режим **Data Analysis**.
2. Просматривать данные отдельно по каждому каналу.
3. 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, повысить уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговых линий (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер и не пересекают кривых отрицательных образцов. В таблице результатов (окно **Quant. Results**) появятся значения *Ct* для анализируемого канала.
4. Для анализа результатов нажать кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) **или** активировать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (iQ5).