

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения ДНК

Streptococcus agalactiae в клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *Streptococcus agalactiae*-

скрин-титр-FL»

Формат FRT

АмплиСенс[®]



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 *Streptococcus agalactiae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae*-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 ¹
канал для флуорофора FAM	FAM/Green
канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6GYellow/Cy3
канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR

¹ 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 более предпочтителен 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 (установить **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 контроль 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 надсадочную 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 (ОК) внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О ДНК *Streptococcus agalactiae*** и ДНК человека.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 минут при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens** (bioMeriueх), 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 ПЦР-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 экстракции (ОК) в пробирку, предназначенную для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О ДНК *Streptococcus agalactiae*** и ДНК человека.
7. В отдельной стерильной пробирке на 2 мл смешать **магнитную силику NucliSens** и **ВКО STI-87** стерильными наконечниками с фильтром в следующем соотношении:

NucliSENS easyMAG

Количество образцов для экстракции ДНК	Количество магнитной силики NucliSens (мкл)	Количество ВКО STI-87 (мкл)
1	10	10
24 (полная загрузка прибора)	250 (с запасом на 25 проб)	250 (из двух пробирок)

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, ВКО STI-87 на вортексе до однородного состояния.
12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **20 мкл смеси**. Каждую пробирку тщательно перемешать пипетированием с помощью многоканальной пипетки 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 ДНК-пробами перенести в зону ПЦР-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)

Поместить микропробирки 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 его 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*).

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/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. 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 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

функции **15 μ l oil layer volume/15 μ L объем масла/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 «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	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:
- осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange (нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**);
 - для установки калибровки всех каналов нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал - 5, Max Reading/Максим. Сигнал - 10**. Отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st 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 образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «K–», положительный – «K+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC/Контроль-Фон**. Для калибраторов – тип **Standard/Стандарт** и указать их концентрации в столбце **Given Conc.** Значения 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!

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 ДНК *Streptococcus agalactiae* по каналу JOE/Yellow:

1. Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (в случае количественного анализа).
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 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 таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct* и значения концентрации ДНК (**Calc Conc (copies/reaction)**).

Анализ результатов амплификации ВКО Glob (канал FAM/Green):

1. Проверьте, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации в случае количественного теста.
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 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 %**.

Анализ результатов амплификации ВКО STI-87 (ROX/Orange):

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. ROX/Cycling A. Orange, 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 таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct** для **ДНК STI-87** значения концентраций (**Calc Conc (copies/reaction)**).

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, 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 блок питания оптической части прибора.

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

2. Запустить программу iCycler iQ5.

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

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. Войти в режим создания нового протокола амплификации, нажав кнопку **Create new**, в модуле **Workshop**.

2. В открывшемся окне задать соответствующие параметры амплификации:

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество 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, ROX	
	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, FAM** и **ROX** 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 трем каналам **JOE/HEX, FAM, ROX**.
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. Просматривайте данные отдельно по каждому каналу.
3. Для каждого канала проверьте правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, повысьте уровень порога, нажав кнопку **Log View** и установив уровень пороговых линий (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции 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 активировав кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (iCycler iQ5).

Анализ результатов амплификации *Streptococcus agalactiae* (канал JOE/HEX)

Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (для количественного анализа).

В таблице результатов появятся значения *Ct* для ДНК *Streptococcus agalactiae*.

1. В отрицательном контроле (ОК) экстракции – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
2. В отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ТЕ-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
3. В положительном контроле (ПК) экстракции – **ПКО ДНК *Streptococcus agalactiae* и ДНК человека** – значение концентрации должно укладываться в диапазон

значений указанный во вкладыше.

4. В **ДНК-калибраторах** должны появиться значения *Ct* и значения концентраций.

Анализ результатов амплификации ВКО Glob (канал FAM)

Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (для количественного анализа).

1. В таблице результатов должны появиться значения *Ct* в каждом исследуемом образце, а для количественных тестов – значения концентраций (***copies/reaction***).
2. В отрицательном контроле (ОК) экстракции – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
3. В отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ТЕ-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
4. В положительном контроле (ПК) экстракции – **ПКО ДНК *Streptococcus agalactiae* и ДНК человека** – должно появиться значения *Ct* и значение концентрации.
5. В **ДНК-калибраторах** должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (***copies/reaction***) по каналу для флуорофора FAM.

Анализ результатов амплификации ВКО STI-87 (канал ROX)

Проверить, чтобы в таблице образцов были обозначены калибраторы и заданы их концентрации (для количественного анализа).

1. В таблице результатов должны появиться значения *Ct* для **ДНК STI-87** в каждом исследуемом образце и отрицательном контроле экстракции (ОК), а для количественных тестов – значения концентраций (*copies/reaction*). При этом значение *Ct* не должно превышать значение, указанное во вкладыше.
2. В отрицательном контроле (К-) ПЦР – **ТЕ-буфер** – не должно быть каких-либо значений *Ct*.
3. В **ДНК-калибраторах** должны появиться значения *Ct* и значения концентраций (для количественных тестов).

Расчет концентрации ДНК *Streptococcus agalactiae*

Расчет концентрации ДНК *Streptococcus agalactiae* на мл образца при экстракции из 100 мкл провести по формуле:

$$\text{Расчетная концентрация ДНК } \textit{Streptococcus agalactiae} \times 100 = \text{копии/мл}$$

К каждому набору реагентов прилагается **Вкладыш**, в котором указаны концентрации ДНК-калибраторов, необходимые для расчета концентраций исследуемых проб и оценки достоверности полученных результатов.

Пример расчета с помощью таблицы Excel копий ДНК *Streptococcus agalactiae* на мл (см. табл. 1):

1. Скопировать имена образцов в первый столбец таблицы Excel (Столбец А).
2. Скопировать значения концентраций *Streptococcus agalactiae* (по каналу для флуорофора JOE/HEX) во второй столбец таблицы Excel (столбец В).
3. В следующем столбце задать формулу ($=B*100$), как показано в приводимой ниже таблице. В ячейках последнего столбца появятся значения концентраций ДНК *Streptococcus agalactiae* на мл образца.

Таблица 1

Пример расчета с помощью таблицы Excel копий ДНК *Streptococcus agalactiae* на мл образца

Name	Calc Conc (copies/reaction) Yellow (JOE/HEX)	ДНК <i>Streptococcus agalactiae</i> , копий/мл образца
A	B	$= B*100$
1	42	4200
2		
3	12	1200
4	7	700
5		
K1 SAG	10457	
K1 SAG	9563	
K2 SAG	96	
K2 SAG	104	
K-		