МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Coxiella burnetii*

в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-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) 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 Mx3000P (Stratagene, США) 14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) 17

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-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 и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Mx3000P (Stratagene, 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/R6G/Yellow/Cy3

[1] Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций 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, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – русифицированную программу Rotor-Gene 6000 версии 1.8.17.5 (или выше), или 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 англоязычной версии программы Rotor-Gene 3000/для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

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

Программирование амплификатора

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

7. В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку ***Edit profile/Редактор профиля*** и задать следующие параметры (см. табл. 1):

Таблица 1

Программа амплификации

Цикл	***Температура, °C***	***Время***	***Измерение флуоресценции***	***Кол-во циклов***
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	56	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

8. Нажать кнопку ***OK/Да***.
9. В окне ***New Run Wizard/Мастер Нового Теста*** нажать кнопку ***Calibrate/Gain Optimisation…/Опт.уровня сигн***.
   - осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (нажать кнопку ***Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых***);
   - калибровать перед первым измерением (***Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции***);
   - установка калибровки канала для всех красителей от 5Fl до 10Fl (кнопка ***Edit…/Правка…***, окно ***Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала***). Нажать кнопку ***Close/Закрыть***.
10. Нажать кнопку ***Next/Далее***, запустить амплификацию кнопкой ***Start run/Старт***.
11. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
12. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке ***Name/Имя*** указать названия/номера исследуемых клинических и контрольных образцов. Для пустых ячеек установить тип ***None/Пусто***.

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

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/Коррек. 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***) равным ***5 %***.
7. В меню ***Eliminate cycles before:/Исключить циклы до:*** (в правой части окна) выставить ***– 5.***
8. В таблице результатов (окно ***Quant. results/Количественные Результаты***) появятся значения *Ct.*

Анализ результатов реакции амплификации по каналу JOE/Yellow:

1. Активировать нажатием в меню кнопки ***Analysis/Анализ***, выбрать режим анализа ***Quantitation/Количественный***, активировать кнопку ***Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow***, ***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***) необходимо активировать 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 (***NTC threshold /Порог Фона -***

ПФ) равным ***5 %***.

7. В меню ***Eliminate cycles before:/Исключить циклы до:*** (в правой части окна) выставить ***– 5.***
8. В таблице результатов (окно ***Quant. results/Количественные Результаты***) появятся значения *Ct.*

ВНИМАНИЕ! При анализе кривых флуоресценции по всем каналам в том случае, если кривые флуоресценции не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (***NTC threshold /Порог Фона – ПФ***) равным ***10 %***.

Интерпретация результатов

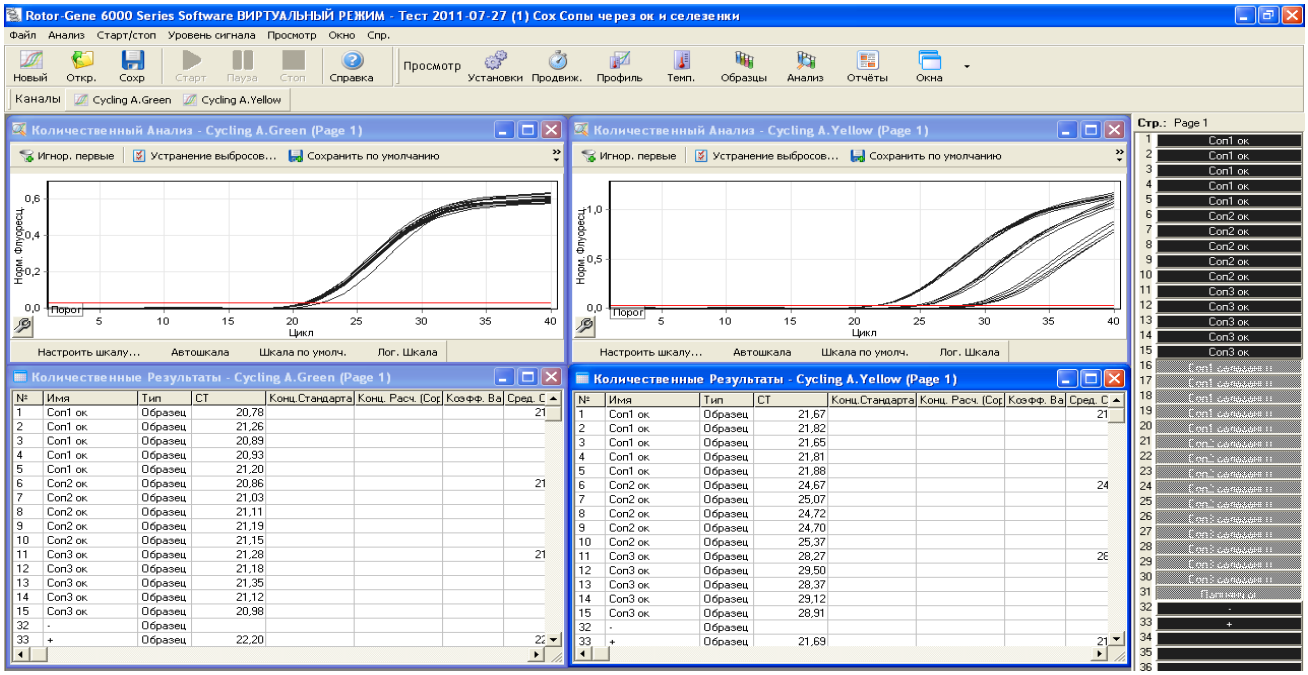
Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного и положительного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями *Ct* указаными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

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

ВНИМАНИЕ!

1. Образцы (кроме К–) для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К– отрицательный результат по всем каналам является нормой.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу JOE/Yellow отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
3. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) по каналу для флуорофора JOE/Yellow и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла *Ct,* необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ



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

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

2. Открыть программу ***iCycler/iQ5***.
3. Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках:
   - Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета в окне ***Selected Plate Setup*** модуля ***Workshop*** нажать кнопку ***Create New*** или ***Edit***. Редактировать схему планшета возможно в режиме ***Whole Plate loading***. В опции ***Select and load Fluorophores*** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам FAM и JOE/HEX. Задать объем реакции ***(Sample Volume)*** 25 мкл, тип крышек ***(Seal Type): Domed Cap***, тип пробирок ***(Vessel Type): Tubes***. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку ***Save&Exit Plate Editing***.
   - Для прибора **iCycler iQ** 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**, **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 использованный ранее ***Plate Setup***. Для этого в окне ***Library*** открыть ***View Plate Setup***, выбрать нужный ***Plate Setup*** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку ***Edit*** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку ***Run with***

selected protocol.

4. Задать программу амплификации (табл. 4).

Таблица 4

Программа амплификации

Цикл	***Температура, °С***	***Время***	***Измерение флуоресценции***	***Кол-во циклов***
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	25 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	56	25 с	FAM/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530	
	72	15 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола в окне ***Selected Protocol*** модуля ***Workshop*** нажать кнопку ***Create New*** или ***Edit***. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку ***Save&Exit Protocol Editing***. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке ***Protocol*** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке ***Users***).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию ***Edit Protocol*** модуля ***Workshop***. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: ***Cycle 3 – Step 2***. Сохранить протокол, задав имя файла в окне ***Protocol Filename*** (файл с расширением .tmo) и нажав кнопку ***Save this protocol*** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке ***View Protocol*** в модуле ***Library***. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку ***Run with selected plate setup***.

5. Поместить предварительно подготовленные пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

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 стрипы/плашку при установке в прибор.

- 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***. Амплификацию необходимо проводить с использованием такого же типа пластика, в котором проводилась калибровка прибора. Нажать кнопку ***Begin Run*****,** дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать ***OK***. Выбрать тип крышек *(**Seal Type – Domed cap**),* тип пробирок *(**Vessel Type – Tubes**).*

- 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 ***Persistent 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 эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать ***OK.***

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора 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.

- Для прибора **iCycler iQ** в модуле ***Library*** активировать окно ***View Post-Run Data***. В окне ***Data Files*** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку ***Analyse Data*****.** В опции ***PCR Quantification*** в меню ***Select a Report*** выбрать значок соответствующего канала. При этом должен быть выбран режим анализа данных ***PCR Base Line Subtracted Curve Fit*** (выбирается по умолчанию). В меню ***Threshold Cycle Calculation*** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю ***Baseline Cycles*** выбрать ***Auto Calculated***, а в подменю ***Threshold Position*** выбрать ***User Defined***. Чтобы установить уровень пороговой линии нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу ***Recalculate Threshold Cycles***. В таблице результатов появятся значения *Ct.*

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне ***Data File*** модуля ***Workshop****)* и нажать кнопку ***Analyze*****.** Выбрать в окне модуля данные по соответствующему каналу**.** При этом должен быть выбран режим анализа

данных ***PCR Base Line Subtracted Curve Fit*** (выбирается по умолчанию).

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО:

1. Нажать в меню анализа данных (***Data Analysis***) кнопку ***FAM***.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию ***Baseline Threshold***.
3. Установить следующие параметры: в меню ***Base Line Cycles*** выбрать ***User Defined***, ***Select all***, ***Edit Range*** и задать ***Start Cycle = 2*****,*** ***Ending Cycle = 20***; в меню ***Crossing Threshold*** выбрать ***User Defined***, задать ***Threshold Position = 200*****.** Нажать ***OK***.
4. В таблице результатов (окно ***Results***) появятся значения *Ct*.

Анализ результатов амплификации ДНК *Coxiella burnetii*:

1. Нажать в меню анализа данных (***Data Analysis***) кнопку ***JOE***.
2. На графике накопления кривых флуоресценции правой кнопкой мыши выбрать опцию ***Baseline Threshold***.
3. В открывшемся окне установить следующие параметры: в меню ***Base Line Cycles*** выбрать ***User Defined***, ***Select all*****,*** ***Edit Range*** и задать ***Start Cycle = 2***, ***Ending Cycle = 10***; в меню ***Crossing Threshold*** выбрать ***User Defined***, задать ***Threshold Position = 250***. Нажать ***OK*****.**
4. В таблице результатов (окно ***Results***) появятся значения *Ct*.

Интерпретация результатов

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

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

ВНИМАНИЕ!

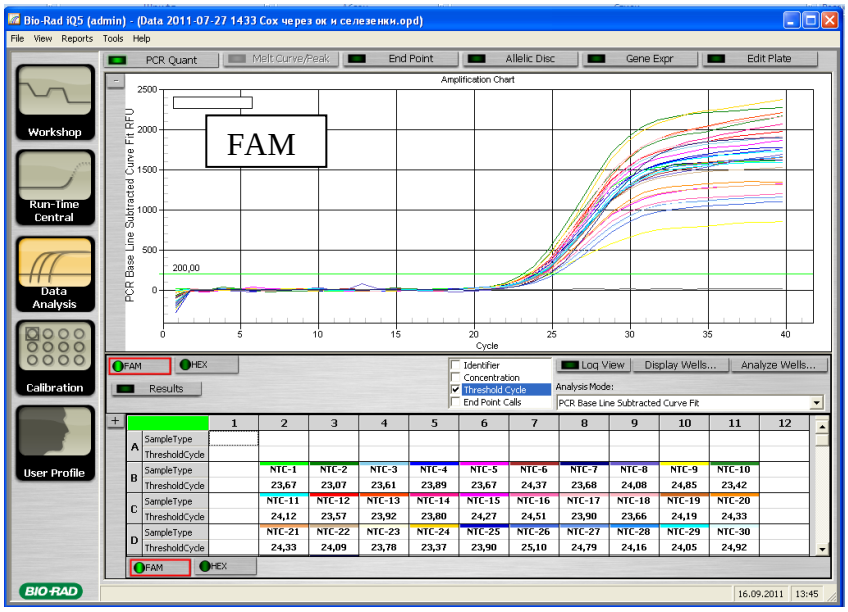
— Образцы (кроме К–) для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К– отрицательный результат по всем каналам является нормой.

— Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу JOE/HEX/JOE-530 отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.

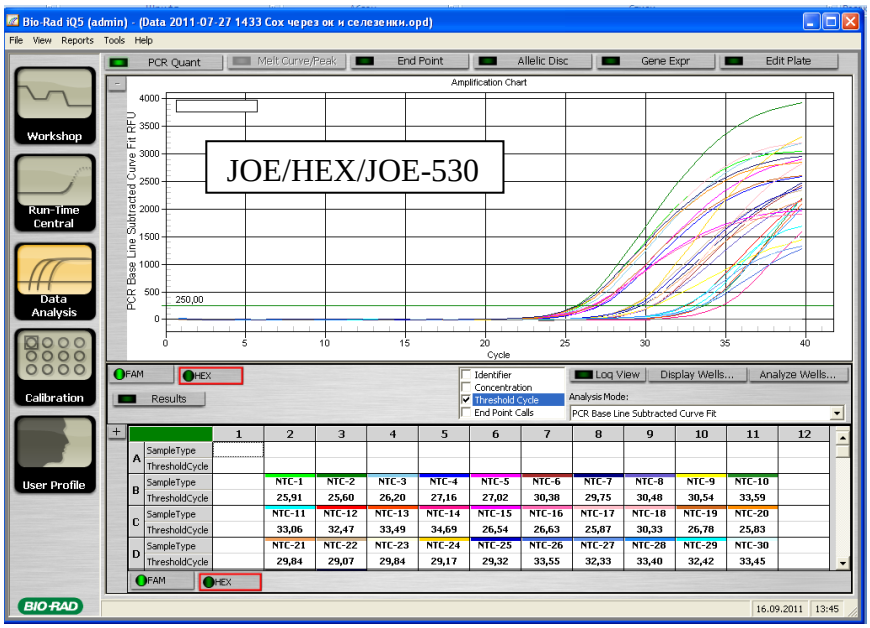
— Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) по каналу для флуорофора JOE/HEX/JOE-530 и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по каналу FAM/FAM-490



Данные по каналу JOE/HEX/JOE-530



ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P (Stratagene, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование прозрачных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (детекция через крышку пробирки).

Программирование амплификатора осуществлять согласно инструкции изготовителя прибора.

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 ***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 пробирки, и обозначить все выделенные ячейки как ***Unknown*** в окне ***Well type***. Для опции ***Collect fluorescence data*** отметить флуорофоры ***FAM, JOE***.
6. В окне ***Well Information*** внести имя для каждого исследуемого образца.
7. На вкладке ***Plate Setup*** задать параметры съема флуоресценции с пробирок. Для этого выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки, и в выпадающем меню ***Well type*** выбрать ***Unknown*** и поле ***Collect fluorescence data***. Отметить флуорофоры ***FAM, JOE*****.**
8. На вкладке ***Thermal Profile Setup*** задать программу амплификации (см. табл. 7).

Таблица 7

Программа амплификации

Цикл	***Температура, °С***	***Время***	***Измерение флуоресценции***	***Кол-во циклов***
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	25 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	56	25 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–	

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

Анализ результатов

1. Открыть сохраненный файл данных и перейти в режим ***Analysis***.
2. Активировать в меню окно ***Results***.
3. В блоке ***Area to analyze*** выбрать строку ***Amplification plots***.
4. В блоке ***Threshold fluorescence*** для каждого из каналов установить уровень пороговой линии на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер: для канала FAM рекомендуется выбрать уровень пороговой линии, равный 500, для канала JOE/HEX – 1000. 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.
5. В блоке ***Area to analyze*** выбрать строку ***Text report.***

Интерпретация результатов

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

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

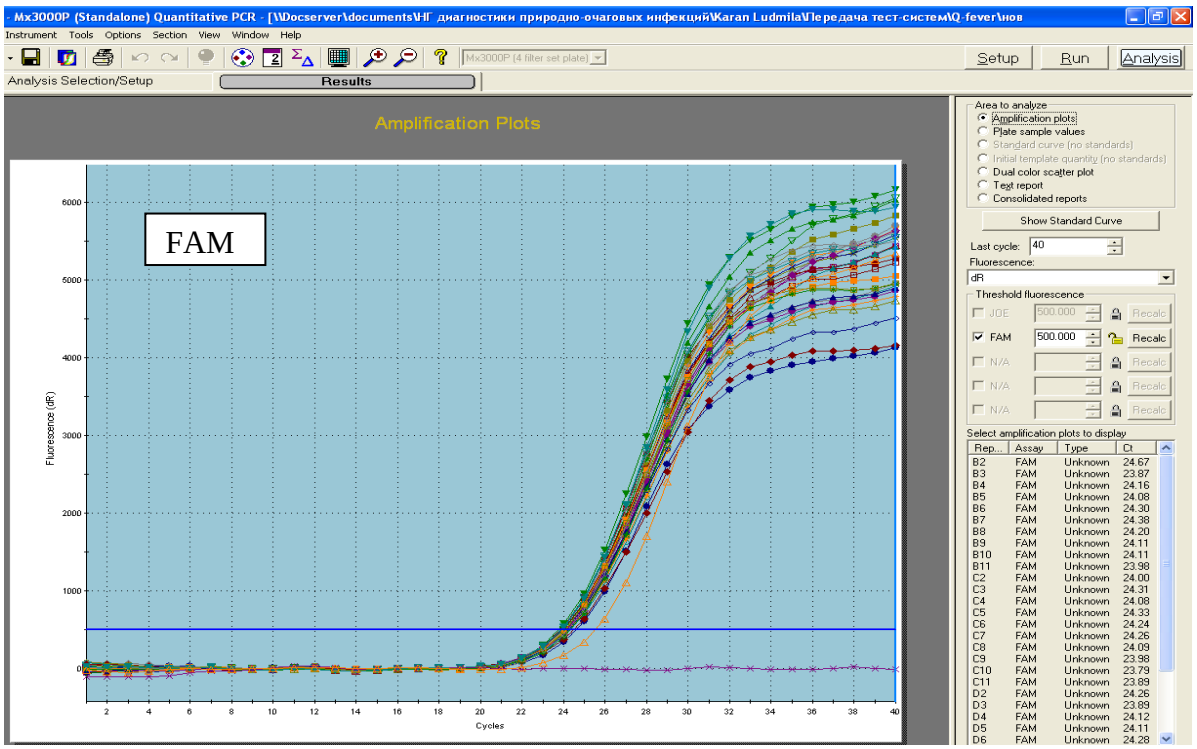
ВНИМАНИЕ!

- Образцы (кроме К–), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К– отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу JOE/HEX отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК, детектируемая по данному каналу.

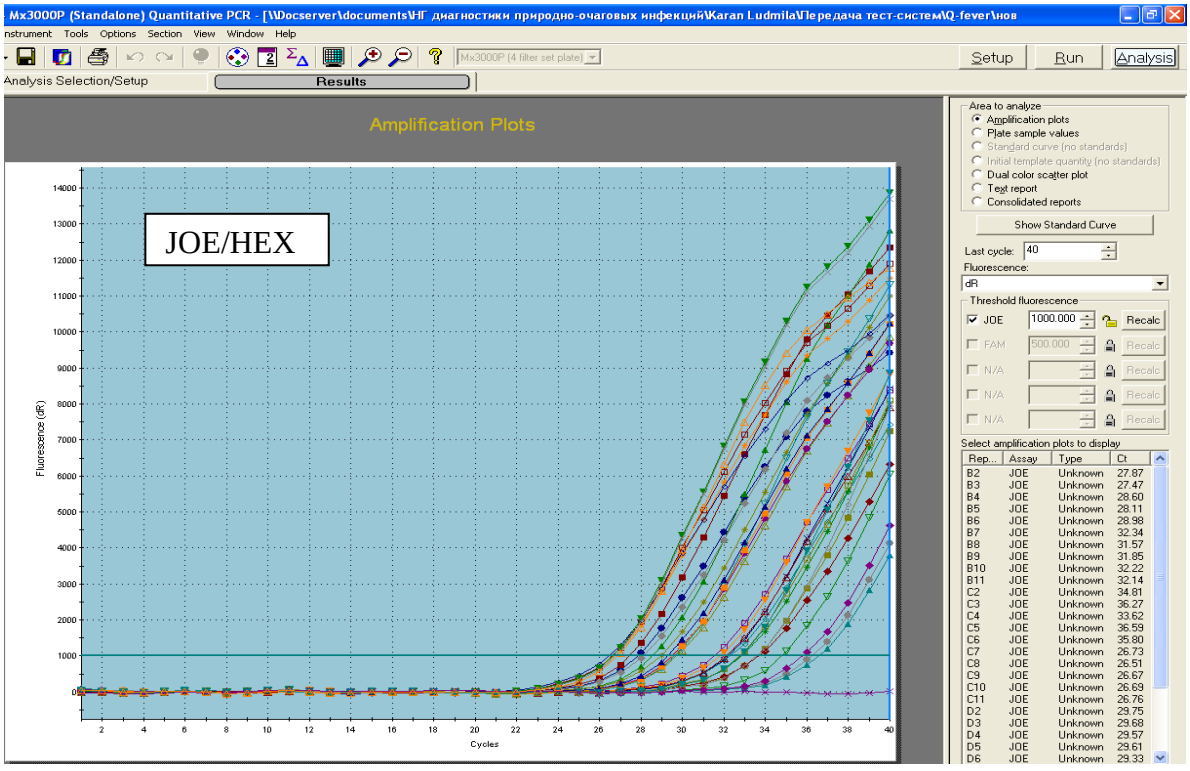
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) по каналу JOE/HEX и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла *Ct,* необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК, детектируемая на данном канале.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по каналу FAM



Данные по каналу JOE/HEX



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

1. Включить прибор и запустить программу ***ДТ-96 v.7.3*.**
2. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим ***Работа с прибором***.
3. В диалоговом окне ***Список приборов*** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку ***Подключить***.
4. В меню ***Тест*** выбрать команду ***Создать новый тест***, ввести название нового теста и нажать кнопку ***ОК***. В появившемся окне ***Тест*** задать следующие параметры:
   - ***Тип*** – ***Качественный***;
   - ***Метод*** – ***Пороговый (Ct)***;
   - ***Пробирки*** – отметить галочкой ***образец***;
   - ***Контроли – положительный – 1, отрицательный – 1;***
   - ***Объем рабочей смеси в пробирке*** – ***25 мкл***;
   - ***Флуорофоры: FAM*** – ***ВКО***; ***JOE*** – **специфика.**
5. Задать программу амплификации с применением команды ***Создать новую программу/редактировать программу*** (см. табл.10):

Таблица 10

Программа амплификации

Цикл	***Температура, °С***	***Время***	***Измерение флуоресценции***	***Кол-во циклов***
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	25 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	56	25 с	Fam, Hex	
	72	15 с	–	

6. Нажать кнопку ***Добавить тест*** и в появившемся окне выбрать соответствующее название теста, указать количество образцов и нажать ***ОК***. Присвоить имена образцам в графе ***Идентификатор*** таблицы ***Протокол***

проведения ПЦР. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора в окне ***Свободное заполнение***. Нажать кнопку ***Применить***.

7. 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.

8. Последовательно нажать кнопки ***Закрыть блок*** и ***Запуск программы***. Сохранить эксперимент.

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 *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

1. Перейти в режим ***Просмотр архива*** и открыть сохраненный файл данных.
2. Указать в выпадающем списке ***Тип анализа: Качественный*.**
3. Указать в выпадающем списке ***Метод: Пороговый Ct*.**
4. Нажать кнопку ***Изменить параметры анализа***. В открывшейся вкладке установить **Критерий положительного результата ПЦР – 60 %, *Величина Threshold – 10*, *Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 5 %***. Опцию ***Нормализация данных*** не использовать (галочка в соответствующем окне должна отсутствовать). Нажать кнопку ***Применить***.
5. Отключить ***Фитирование (сглаживание) данных*** при помощи кнопки ***Ф*** (отжать кнопку).
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии.

Поочередно для каналов Fam и Hex установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на значении, при котором кривые флуоресценции носят сигмовидный характер. Рекомендуемая пороговая линия для каналов Fam и Hex – ***50*.** В том случае, если кривые флуоресценции пересекают пороговую линию, не имея

характерную сигмовидную форму, уровень пороговой линии необходимо повысить. Нажать кнопку ***Отчет***. Нажать кнопку ***Сохранить отчет как…*** (рекомендуется сохранять отчет в папку ***Мои документы***), выбрать формат ***MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML*****,** выбрать папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку ***Сохранить***.

Интерпретация результатов

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

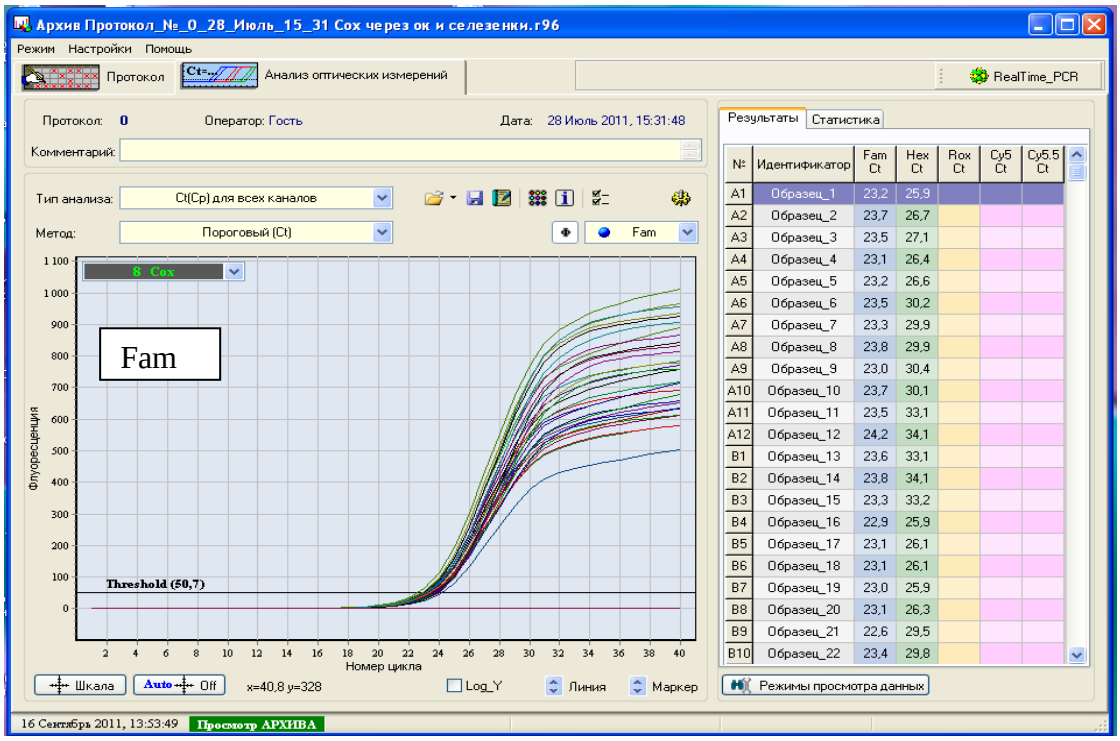
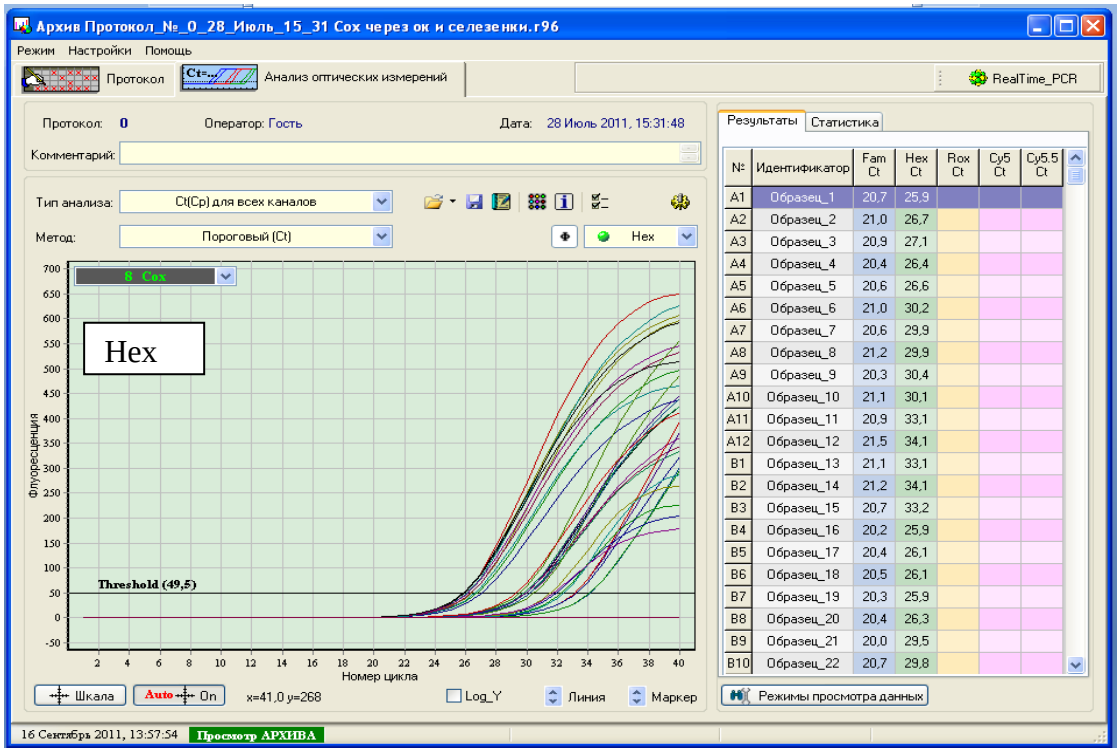
Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ!

- Образцы (кроме К–), для которых получен отрицательный результат по всем каналам, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции. Для образца К– отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу Hex отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
- Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) по каналу Hex и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по какому-либо из каналов определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК.

ПРИМЕР ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по каналу Fam



Данные по каналу Hex