

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса краснухи (*Rubella virus*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *Rubella virus-FL*»

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ NucliSENS® easyMAG (bioMérieux, Франция)	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия).....	7
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай)	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США).....	17

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления РНК вируса краснухи (*Rubella virus*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Rubella virus*-FL» совместно с приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- RotorGene 3000, RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия);
- iQ iCycler, iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США),
- Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США).

а также совместно с автоматической станцией для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция).

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
Канал для флуорофора ROX	ROX/Orange/TxR
Канал для флуорофора Cy5	Cy5/Red

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ NucliSENS® easyMAG (bioMérieux, Франция)

Вариант 1. Выделение РНК с лизисом образца вне прибора.

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

1. Включить прибор «NucliSENS® easyMAG» и подготовить его к выделению РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения РНК (установить *Other*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*)- **55** mkl, тип образца (*Type*) –Lysed, очередность выделения РНК в образцах (*priority*)- normal.
3. Создать новый протокол выделения РНК/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 выделения РНК/ДНК в приборе «NucliSENS® easyMAG™», (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI 87-rec**. 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 выделения РНК/ДНК в приборе «NucliSENS® easyMAG™».

6. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО**, внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО Rubella virus-rec**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.

9. Ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens (bioMerieux), интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 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 выделения РНК с лизисом образцов вне прибора (*off board*).
11. После окончания экстракции РНК, извлечь пробирки из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК**.

При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после экстракции. **Очищенные РНК можно хранить до 8 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца при минус 16 °С, более длительно – при температуре минус 70 °С.**

Вариант 2. Выделение РНК с лизисом образца в приборе.

Порядок работы.

1. Включить прибор «NucliSENS® easyMAG» и подготовить его к выделению РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения РНК (установить *Other*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml или 1 ml, объем элюции (*Eluate*) – **55 mkl**, тип образца (*Type*) – Primary, очередность выделения РНК в образцах (*priority*) – normal.
3. Создать новый протокол выделения РНК/ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: *On-board Lysis Buffer Dispensing-Yes, On-board Lysis Incubation-Yes*.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для выделения РНК/ДНК в приборе «NucliSENS® easyMAG», (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-rec**.
6. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО**, внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером и тщательно перемешать пипетированием (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) внести **100 мкл ОКО**. В

пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО *Rubella virus-rec.***

8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения РНК с лизисом образцов в приборе (on board).
9. Дождаться, пока автоматическая станция «NucliSENS® easyMAG» не остановит работу в положении «Instrument State-Idle».
10. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens** (bioMeriueх), интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора и в каждую пробирку Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером (или с использованием многоканальной пипетки с одноразовыми наконечниками с аэрозольным барьером на 200 мкл) по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Закрыть крышку прибора и продолжить программу экстракции РНК.
12. После окончания экстракции РНК, извлечь пробирки из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК провести реакцию ОТ-ПЦР.**

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с прибором Rotor-Gene 6000 – 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.

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).

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

ВНИМАНИЕ! Если вы не полностью заполняете карусель 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). Если в один ротор загружаются пробирки с реагентами от разных наборов реагентов, то в первую лунку должна попасть пробирка с наибольшим количеством флуорофоров и наименьшей их концентрацией.

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) и 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 следующие параметры (см. табл. 1):

Таблица 1

Программа амплификации «АмплиСенс-2»

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	50	15 мин	–	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling / Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

Примечание – С использованием **универсальной программы «АмплиСенс-2»** можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для генотипирования *HCV* и др.). Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

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.»
 - осуществлять калибровку по каналам FAM/Green, JOE/Yellow (нажать кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт. Детектируемых каналов»);
 - 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 3FI до 8FI (кнопка

- «Edit...»/«Правка...», окно «Auto gain calibration channel settings»/«Авто-оптимизация уровня сигнала»). 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 – «K+». Напротив всех исследуемых клинических образцов установить тип «Unknown»/«Образец», положительного контроля ПЦР – тип «Positive control»/«Положительный контроль», отрицательного контроля ПЦР – тип «Negative Control»/«Отрицательный контроль». 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». По одному из каналов – **FAM/Green** – регистрируют накопление продукта амплификации участка **кДНК STI-87-rec (ВКО)**, а по другому – **JOE/Yellow** – **ПКО кДНК Rubella virus**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией и последующего сравнения величины сигнала (*Ct*) в исследуемых образцах относительно контрольных (**ПКО Rubella virus-rec** и **ВКО STI-87-rec**).

Анализ результатов реакции амплификации кДНК Rubella virus (канал 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. В меню основного окна («Quantitation analysis»/«Количественный анализ») должны быть активированы кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррект.уклона».

4. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии Threshold/Порог = **0.03**.
5. Выберите параметр «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» и установите значение порога отрицательных проб «NTC threshold»/«Порог Фона» равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно «Quant. results»/«Количественные Результаты») появятся значения «Ct».
7. В отрицательном контроле (ОК) выделения – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений «Ct».
8. В отрицательном контроле (К-) ОТ-ПЦР – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений «Ct».
9. В положительном контроле ОТ-ПЦР – **ПКО кДНК Rubella virus и STI** – значение «Ct» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладыше к набору реагентов.
10. В положительном контроле выделения РНК – **ПКО Rubella virus-rec** – значение «Ct» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладыше к набору реагентов.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал 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. В меню основного окна («Quantitation analysis»/«Количественный анализ») должны быть активированы кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррект.уклона».
4. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии Threshold/Порог = **0.03**.
5. Выберите параметр «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» и установите значение порога отрицательных проб (NTC threshold /Порог Фона - ПФ) равным **10 %**.
6. В таблице результатов (окно «Quant. results»/«Количественные Результаты») появятся значения «Ct» для **ВКО** в каждом исследуемом образце.
7. В отрицательном контроле (К-) ОТ-ПЦР – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений «Ct».
8. В положительном контроле ОТ-ПЦР – **ПКО кДНК Rubella virus и STI** – значение

«Ct» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладыше к набору реагентов.

9. В отрицательном контроле (ОК) выделения РНК – **ОКО** – значение «Ct» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладыше к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO.,LTD, Китай)

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

Запуск прибора и анализ результатов проводить при помощи программного обеспечения FRT Manager.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler 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, запустить программу iQ5.

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

2. Поместить микропробирки или стрипы (часть планшета) или планшет 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 стрипы/планшет 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 параметры амплификации (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-2»

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

Примечание – С использованием универсальной программы «АмплиСенс-2»

можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для генотипирования *HCV* и др.). Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

3. Дать название новому протоколу и сохранить его.
4. Создать новый планшет 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 «-». Для всех образцов задать измерение флуоресценции по двум каналам HEX-530 и FAM-490.
6. Дать название схеме расположения пробирок и сохранить ее.
7. Для запуска прибора нажать кнопку «Run» (для прибора «iQ5») или «Run with selected protocol» (для прибора «iQ iCycler»). В открывшемся окне указать объем образца 25 мкл. Для прибора «iQiCycler» использовать способ определения фактора лунок по экспериментальному планшету «Experimental Plate». Для прибора «iQ5» допускается использование как режима с измерением факторов лунок по экспериментальным пробиркам, так и фиксированных факторов лунок (рекомендуется). Нажать кнопку «Begin Run» и сохранить эксперимент.

Анализ результатов

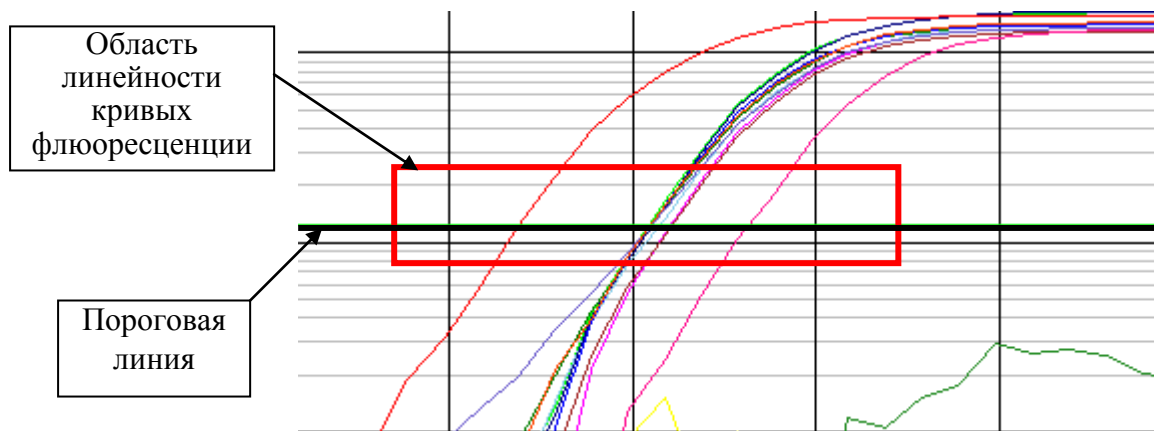
Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По одному из каналов – **FAM** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **кДНК STI-87-rec (ВКО)**, а по другому – **JOE/HEX** – **кДНК Rubella virus (ПКО)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией и последующего сравнения величины сигнала (Ct) в исследуемых образцах относительно контрольных (**ПКО Rubella virus-rec** и **ВКО STI-87-rec**).

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.

- Для каждого из анализируемых каналов необходимо нажать кнопку «Log View». Установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флюоресценции носят линейный характер (см. рисунок)



- Для анализа результатов нажать кнопку «PCR Quant» (для прибора «iQiCycler») или активировав кнопку «Results», (расположена под кнопками с названиями флуорофоров) (для прибора «iQ5»). В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct для анализируемого канала.

Анализ результатов реакции амплификации кДНК *Rubella virus* (канал JOE/HEX):

- Откроется окно Microsoft Excel. В таблице результатов в колонке Ct (dR) появятся значения «Ct».
- В отрицательном контроле (OK) выделения – **ОКО** – не должно быть каких-либо значений «Ct».
- В отрицательном контроле (К-) ОТ-ПЦР – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений «Ct».
- В положительном контроле ОТ-ПЦР – **ПКО кДНК *Rubella virus* и STI** – значение «Ct» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладыше к набору реагентов.
- В положительном контроле выделения РНК – **ПКО *Rubella virus-rec*** – значение «Ct» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладыше к набору реагентов.

Анализ результатов реакции амплификации ВКО (канал FAM):

- Далее активируйте отображение флуоресцентного канала FAM (кнопка «FAM» нажата в поле «Dyes Shown» внизу окна программы).
- В поле «Area to analyze» выберите пункт «Text Report». Перейдите в меню «File», далее к пункту «Export Text Report» и далее к пункту «Export Text Report to Excel». Откроется окно Microsoft Excel. В таблице результатов в колонке Ct (dR) появятся

значения «Ct».

3. В отрицательном контроле (К-) ОТ-ПЦР – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений «Ct».
4. В положительном контроле ОТ-ПЦР – **ПКО кДНК *Rubella virus* и STI** – значение «Ct» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладке к набору реагентов.
5. В отрицательном контроле (ОК) выделения РНК – **ОКО** – значение «Ct» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладке к набору реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов.

1. Включите прибор, запустите программу Stratagene Mx3000P.
2. В окне «*New Experiment Options*» выберите пункт «*Quantitative PCR (Multiple Standards)*» и установите флажок «*Turn lamp on for warm-up*».

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

3. Установите пробирки в прибор, закройте крышку.
4. В меню «Options» выбрать пункт «Optics Configuration» и на вкладке «Dye Assignment» напротив пункта «HEX/JOE filter set» установить параметр JOE, напротив пункта «FAM filter set» установить параметр FAM.

ВНИМАНИЕ! Будьте внимательны! Не переворачивайте стрипы/плашку при установке в прибор.

5. Закрыть фиксатор и дверцу прибора.
6. В окне «New Experiment Options» выбрать пункт «Quantitative PCR (Multiple Standards)» и установить флажок «Turn lamp on for warm-up».
7. В меню «Plate Setup» задать параметры измерения флуоресценции. Для этого:
 - выбрать все ячейки, в которых установлены исследуемые микропробирки или стрипы (удерживая клавишу «Ctrl» и выделяя необходимый диапазон мышью).
 - обозначить все выделенные ячейки как «Unknown» в окне «Well type». Для опции «Collect fluorescence data» установить два флажка «FAM» и «JOE». Далее, дважды щелкая по каждой ячейке, внести имя для каждого исследуемого образца (Окно «Well Information»). *Внести подписи образцов так же можно во время амплификации или после ее окончания, вернувшись в меню «Plate Setup».*
8. На вкладке «Plate Setup» задайте параметры съема флуоресценции с пробирок. Для этого: выберите все ячейки, в которых установлены исследуемые пробирки (удерживая клавишу *Ctrl* и выделяя необходимый диапазон мышью); в выпадающем меню «Well type» выберите тип «Unknown» и поле «Collect fluorescence data» установите два флажка «FAM», «JOE»; далее дважды щелкая по каждой ячейке внесите подписи пробирок (Окно «Well Information»), положительный контроль обозначьте как «+», отрицательный контроль как «-».
9. Перейти на вкладку «Thermal Profile Setup», задать программу амплификации. Для этого используйте один из следующих способов:

Использование шаблонного файла для задания программы амплификации (рекомендуется).

Нажмите кнопку «*Import...*» справа от изображения профиля термоциклирования. Перейдите в папку, содержащую предшествующий экспериментальный файл, и откройте его. В окне «Thermal Profile» появится необходимый профиль термоциклирования.

Самостоятельное программирование

1. После задания всех необходимых значений и параметров, снова выделить все ячейки, в которых установлены исследуемые микропробирки. Перейти в меню «Thermal Profile Setup», задать программу амплификации, указанную в таблице 3.

Таблица 3

Программа амплификации «АмплиСенс-2»

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

Примечание – С использованием **универсальной программы «АмплиСенс-2»** можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для генотипирования *HCV* и др.). Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

2. Для задания параметра измерения флуоресцентного сигнала при заданной температуре, необходимо выбрать опцию «All points» для параметра «Data collection marker by dragging» и перетянуть ее мышкой с правой части поля на полку с нужной температурой.
3. Запустить амплификацию, нажав кнопку «Run», затем «Start» и присвоив имя файлу эксперимента.

Анализ результатов

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По одному из каналов – **FAM** – регистрируется

накопление продукта амплификации участка **кДНК STI-87-rec (ВКО)**, а по другому – **JOE/HEX – кДНК Rubella virus (ПКО)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией и последующего сравнения величины сигнала (Ct) в исследуемых образцах относительно контрольных (**ПКО Rubella virus-rec** и **ВКО STI-87-rec**).

Обработка данных

1. В программе *Mx3000P* перейдите в раздел «Analysis» выбрав соответствующую кнопку на панели инструментов.
2. На открывшейся вкладке «Analysis Selection/Setup» убедитесь, что все исследуемые образцы активны (ячейки соответствующие образцам должны иметь другой оттенок). В противном случае выберите все исследуемые образцы, удерживая клавишу Ctrl и выделяя необходимый диапазон мышью.
3. Перейдите на вкладку «Results».
4. Убедитесь, что два флуоресцентных канала активны (кнопки «HEX», «FAM» нажаты в поле «Dyes Shown» внизу окна программы).
5. В поле «Threshold fluorescence» убедитесь, что галочки стоят напротив двух флуоресцентных каналов: JOE/HEX, FAM. Проверьте 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, повысьте уровень порога.
6. В поле «Area to analyze» выберите пункт «Text Report». Визуально удостоверьтесь, что все данные сортированы по имени красителя (колонка «Dye»). Для этого однократно нажмите на имя колонки «Dye».
7. Перейдите в меню «File», далее к пункту «Export Text Report» и далее к пункту «Export Text Report to Excel». Откроется окно Microsoft Excel.

Анализ результатов реакции амплификации кДНК Rubella virus (канал JOE/HEX):

1. Откроется окно Microsoft Excel. В таблице результатов в колонке Ct (dR) появятся значения «Ct».
2. В отрицательном контроле (OK) выделения – **ОКО** – не должно быть каких-либо

* По умолчанию кривые накопления сигнала отображаются прибором в линейном виде. Чтобы изменить вид кривых с линейных на логарифмические, дважды щелкните левой кнопкой мыши в области одной из осей (X или Y), в появившемся окне «Graph properties» для оси Y (Y axis) поставьте галочку в поле «Scale» напротив пункта «Log».

значений «Сt».

3. В отрицательном контроле (К-) ОТ-ПЦР – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений «Сt».
4. В положительном контроле ОТ-ПЦР – **ПКО кДНК *Rubella virus* и STI** – значение «Сt» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладке к набору реагентов.
5. В положительном контроле выделения РНК – **ПКО *Rubella virus-rec*** – значение «Сt» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладке к набору реагентов.

Анализ результатов реакции амплификации ВКО (канал FAM):

1. Далее активируйте отображение флуоресцентного канала FAM (кнопка «FAM» нажата в поле «Dyes Shown» внизу окна программы).
2. В поле «Area to analyze» выберите пункт «Text Report». Перейдите в меню «File», далее к пункту «Export Text Report» и далее к пункту «Export Text Report to Excel». Откроется окно Microsoft Excel. В таблице результатов в колонке Ct (dR) появятся значения «Сt».
3. В отрицательном контроле (К-) ОТ-ПЦР – **РНК-буфер** – не должно быть каких-либо значений «Сt».
4. В положительном контроле ОТ-ПЦР – **ПКО кДНК *Rubella virus* и STI** – значение «Сt» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладке к набору реагентов.
5. В отрицательном контроле (ОК) выделения РНК – **ОКО** – значение «Сt» не должно превышать значения порогового цикла, указанного во вкладке к набору реагентов.