

РУКОВОДСТВО

по работе с приборами для ПЦР
с гибридационно-флуоресцентной детекцией
продуктов амплификации в режиме «реального времени»
совместно с наборами реагентов АмплиСенс® / AmpliSens®

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
СООТВЕТСТВИЕ ФЛУОРОФОРОВ И КАНАЛОВ ДЕТЕКЦИИ	4
РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРАМИ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)...	5
РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРОМ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)	12
РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРОМ «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	16
РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРОМ CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	21
РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРОМ SmartCycler II (CERHEID, США)	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР или ОТ-ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР или ОТ-ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПО	- программное обеспечение
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

ВВЕДЕНИЕ

Руководство описывает порядок работы со следующими приборами для ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» совместно с наборами реагентов АмплиСенс® / AmpliSens®:

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

ВНИМАНИЕ! Перечень приборов и их настройки указаны во вкладке к используемому набору реагентов.

СООТВЕТСТВИЕ ФЛУОРОФОРОВ И КАНАЛОВ ДЕТЕКЦИИ

Флуорофор	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Название канала детекции для разных приборов	FAM/ Green	JOE/HEX/R6G/ Yellow/Cy3	ROX/Orange/ TxR	Cy5/ Red	Cy5.5/Crimson/ Quasar705

РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРАМИ 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.

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

Приборы Rotor-Gene 3000/6000 и Rotor-Gene Q относятся к приборам роторного типа. При работе с данными приборами детекция флуоресценции осуществляется через дно пробирки. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, 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).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки или стрипы в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена пробиркой с исследуемым образцом (*не должна быть пустой*).

ВНИМАНИЕ! Если в один ротор загружаются пробирки с реагентами от разных наборов реагентов или с разными ПЦР-смесями-FL, то в программе Rotor-Gene необходимо указать номера пробирок для калибровки по каждому каналу детекции. Необходимо соблюдать рекомендации по калибровке для наборов реагентов, перечисленных в информационном листе «Дополнительные требования к выставлению диапазонов калибровки каналов (приоритеты калибровки) для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)».

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. Для этого можно создать шаблон для проведения теста и пользоваться готовым шаблоном при последующих постановках.

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.

Создание шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
2. Во вкладке выбрать шаблон **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл** для редактирования и нажать кнопку **New/Новый**.
3. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (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 объем реакционной смеси **Reaction volume/Объем реакции**, указанный в эксплуатационной документации к набору реагентов. При необходимости (см. эксплуатационную документацию к набору реагентов) установить галочку напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
5. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, указанную в инструкции по применению набора реагентов. Нажать кнопку **OK/Да**.
6. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне:
 - а) для оптимизации измерения сигнала по каждому выбранному каналу установить калибровку (значения минимального и максимального сигнала см. во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов).
Для этого нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-ных**, в открывшемся для первого канала окне (**Auto Gain Optimisation Channel Settings/Auto Gain Calibration Channel Settings/Установки Авто-оптимизации уровня сигнала**) указать в строке **Target Sample Range/Нужный диапазон стартового сигнала** значения минимального и максимального сигнала, нажать кнопку **OK**. Автоматически откроется окно для следующего

канала. Проверить выбранные для всех каналов значения можно в графах **Min Reading/Миним. Сигнал, Max Reading/Максим. Сигнал**.

- б) осуществлять калибрование по выбранным каналам перед первым измерением (отметить галочкой **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**). Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

ВНИМАНИЕ! Необходимо соблюдать дополнительные требования к выставлению диапазонов калибровки каналов для наборов реагентов, перечисленных в информационном листе «Дополнительные требования к выставлению диапазонов калибровки каналов (приоритеты калибровки) для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)».

7. Нажать кнопку **Next/Далее**. Для сохранения запрограммированного шаблона необходимо, нажав кнопку **Save Template/Сохр.шаблон**, задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе амплификации, например, для единой программы амплификации рекомендуется название «**АмплиСенс**». Сохранить файл в предлагаемую папку: **Templates/Quick Start Templates**; закрыть окно **New Run Wizard/Мастер Нового Теста**. После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне **New Run/Новый тест**.

Использование готового шаблона для проведения теста

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. В открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**, затем в списке шаблонов выбрать шаблон, запрограммированный согласно описанию в разделе **Создание шаблона**.
2. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (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**.
3. В открывшемся окне, проверить, что указан объем реакционной смеси **Reaction volume/Объем реакции**, и напротив позиции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска** установлена галочка, активирующая эту опцию (см. эксплуатационную документацию к набору реагентов). Нажать кнопку **Next/Далее**.
4. В следующем окне можно проверить правильность программ амплификации и детекции и условий автооптимизации уровня сигнала, заданных в шаблоне. Перейти в следующее окно, нажав кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию

кнопкой **Start run/Старт**. При этом ротор с образцами должен быть уже закреплен и крышка прибора закрыта. Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

- Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К-», положительный – «К+». Напротив всех исследуемых биологических образцов установить тип **Unknown/Образец**, для положительного контроля ПЦР – тип **Positive control/Положительный контроль**, для отрицательного контроля ПЦР – тип **Negative control/Отрицательный контроль**, для калибраторов K1 и K2 – тип **Standard/Стандарт** и в колонке **Given conc./Концентрация** ввести значения для калибраторов, указанные во вкладыше к данной серии набора реагентов (если набор количественный). Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**. Нажать кнопку **Finish/OK/Закончить**.

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

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

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. Если набор количественный, то в соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК/РНК мишени.

Анализ результатов амплификации по каналу FAM/Green:

- Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- 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/или **Slope Correct/Коррект.уклона** только в соответствии с вкладышем к набору реагентов.
5. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог**, указанный во вкладыше к набору реагентов.
6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) в соответствии с вкладышем к набору реагентов. Активировать **Reaction Efficiency Threshold/Порог Эффективности Реакции**, если это указано во вкладыше к набору реагентов. **Reaction Efficiency Threshold/Порог Эффективности Реакции** может быть изменен, если это указано во вкладыше к набору реагентов.
7. В меню **Eliminate cycles before:/Исключить циклы до:** (в правой части окна) выставить значение, если оно указано во вкладыше к набору реагентов.
8. В таблице результатов (окно **Quantitation Results/Количественные Результаты**) появятся значения C_t , а для количественного набора – значения C_t и значения концентрации ДНК/РНК (**Calc Conc (copies/reaction)**).

Анализ результатов по другим каналам провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК/РНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании**Rotor-Gene 3000/6000/Q**

Возможные проблемы	Причина	Признаки	Способы устранения
Отрицательные образцы анализируются программой Rotor-Gene как положительные	Неправильная математическая обработка отрицательных образцов при наличии участка падения флуоресценции на начальных циклах	Типичный положительный образец имеет характерную S-образную кривую накопления флуоресценции. Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид довольно прямых линий, идущих снизу вверх	Необходимо воспользоваться функцией Ignore First/Игнор. первые , выбрав значение 5 циклов. Если это не приводит к должному результату, попробовать увеличить это значение на 1-5
	Пересечение линией порога нисходящих кривых флуоресценции на начальных циклах	На графике обработанных кривых флуоресценции красная линия порога (Threshold) пересекает или «задевает» кривые флуоресценции в левой части графика (первые циклы)	Необходимо воспользоваться функцией Eliminate cycles before.../Исключить циклы до... , задав значение 5 или более, если значение уже указано согласно вкладышу набора реагентов (игнорируется пересечение порога и кривой флуоресценции на первых циклах)
Снижение чувствительности из-за загрязнения линз прибора	Загрязнение линз ведет к снижению эффективности возбуждения и регистрации флуоресценции, что в первую очередь сказывается на образцах с малым количеством специфичной ДНК/РНК, дающих малое увеличение флуоресценции	Низкие значения фонового сигнала по всем каналам измерения флуоресценции (<1) при максимальном значении множителя gain (10)	Необходимо проводить очистку горизонтальной и вертикальной линз прибора сухим одноразовым ватным тампоном не реже 1 раза в месяц
Отсутствие флуоресцентных кривых при значениях флуоресценции меньше 1 или больше 100 единиц	Не задан параметр калибровки, указанный во вкладыше к набору реагентов, или ошибка в первой пробирке ротора (ее отсутствие, неправильное внесение образца ДНК/РНК или реакционной смеси)	Большинство фоновых сигналов флуоресценции меньше 1 или больше 20	Повторить ПЦР, задав параметры по калибровке согласно информационному листу «Дополнительные требования к выставлению диапазонов калибровки каналов (приоритеты калибровки) для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)», если набор перечислен в данном листе, или задав параметр калибровки. Убедиться, что лунка 1 ротора заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (не пустой)

Информацию по всем установленным параметрам эксперимента, а также отчет по калибровке можно найти, просмотрев установки эксперимента (кнопка **Settings/Установки**). В частности, вкладка **Messages/Сообщения** пункт **Autocalibration Log Messages/Сообщение об авто-оптимизации уровня сигнала** – отчет о калибровке.

РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРОМ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

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

Прибор iCycler iQ5 относится к приборам планшетного типа. При работе с данными приборами детекция флуоресценции осуществляется через крышку пробирки. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

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

2. Запустить программу iCycler iQ5.

3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. Для этого можно создать шаблон для проведения теста и пользоваться готовым шаблоном при последующих постановках.

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

Создание шаблона для проведения теста

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

- в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**;
- в открывшемся окне нажать кнопку **Whole Plate loading** и задать схему планшета, используя кнопки верхней панели. Указать имя проб в столбце **Identifier/Condition** в появившейся строке в нижней части экрана. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам, указанным в инструкции по применению набора реагентов. Нажать кнопку **Select/Add Fluorophores** и в

- открывшемся окне выбрать флуорофор, отметив его в графе **Selected** галочкой. Нажать **OK**. В окне **Fluorophore** появится название канала. Чтобы добавить измерение флуоресцентного сигнала к каждой пробе, необходимо нажать на флуорофор, чтобы он был активен, и, используя кнопку **Fluorophore loading in whole Plate mode**  над схемой, выделить пробы на планшете;
- задать объем реакции (**Sample Volume**), указанный в инструкции по применению набора реагентов, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**) - **Tubes**;
 - сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.
2. Все биологические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-», калибраторы K1 и K2 как **Std (Standard)**, в колонке **Quantity** ввести значения, указанные во вкладыше к данной серии набора реагентов (если набор количественный). При задании разных значений калибраторов по измеряемым каналам кнопка **Whole Plate Loading** должна быть не активна.
 3. Задать программу амплификации, указанную в инструкции по применению набора реагентов. Для этого в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.
 4. Перед запуском выполнения программы необходимо проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Для измерения факторов лунок вариант **Use Persistent Well Factors** (предлагается по умолчанию). Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
 5. После окончания программы необходимо закрыть программу и выключить прибор (амплификатор и блок оптической системы).

Использование готового шаблонного файла для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в модуле в **Workshop** выбрать в верхнем левом окне необходимый файл постановки;

- в блоке **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и отредактировать схему планшета (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **SampleFiles**);
- в блоке **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и проверить правильность выбранного протокола (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения 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. Если набор количественный, то в соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК/РНК мишени.

1. Запустить программу, выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
2. Выбрать режим анализа данных **Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (установлен по умолчанию).
3. Установить пороговую линию поочередно для каждого из каналов на определенном уровне (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой) в соответствии с вкладышем, прилагаемым к набору реагентов. Для этого нужно нажать кнопку **Log View** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где соблюдаются требования вкладыша, кривые флуоресценции носят линейный характер, и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
4. Для анализа результатов нажать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).
5. Для дальнейшей работы с данными в формате Microsoft® Excel щелкнуть правой кнопкой мыши на появившейся таблице с результатами. В выпадающем меню выбрать **Export to Excel**, сохранить файл в необходимую папку.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК/РНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании iCycler iQ5

Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (кривые при этом имеют S-образный вид в линейной шкале)	Установить линию порога на уровне, указанном во вкладыше
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Вызвать окно BaseLine Threshold , щелкнув правой кнопкой мыши на графике флуоресценции, задать диапазон расчета базовой линии, начиная с первого после ступени цикла

РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРОМ «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

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

Прибор «ДТ-96» относится к приборам планшетного типа. При работе с данными приборами детекция флуоресценции осуществляется через крышку пробирки. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор, запустить программу RealTime_PCR v.7.3 и выше, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. Для этого можно создать шаблон для проведения теста и пользоваться готовым шаблоном при последующих постановках.
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**.

Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** на верхней панели выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста, например, для единой программы амплификации рекомендуется название **«АмплиСенс»** и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
 - **Тип** – **качественный**;
 - **Метод** – **Пороговый (Ct)**;
 - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль+, контроль–, стандарт**;
 - **Стандарты** – в поле **количество** – указать число калибраторов; в поле **дубли** – указать число повторов одного калибратора; в колонке **копий** указать концентрацию (для количественных наборов);
 - **Контроли**: **положительный (К+)** – указать количество; **отрицательный (К–)** – указать количество;

- **Объем рабочей смеси в пробирке** – указать согласно инструкции по применению набора реагентов;
 - **Флуорофоры** – указать согласно инструкции по применению набора реагентов;
 - Задать программу амплификации, указанную в инструкции по применению набора реагентов. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.
2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
 3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название, например, **«АмплиСенс»**, указать количество образцов, нажать **ОК**.
 4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
 5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации** указать **объем рабочей смеси**, указанный в инструкции по применению набора реагентов, и нажать кнопку **Запуск программы**.
 6. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.
- ВНИМАНИЕ! 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.**
7. Последовательно нажать кнопки **Закрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

Использование готового шаблонного файла для проведения теста


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

- во вкладке **Протокол** нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название, например, **«АмплиСенс»**, указать количество образцов, нажать **ОК**;

- присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**;
- в меню **Запуск программы амплификации** проверить правильность выбранной программы амплификации и объема реакционной смеси, заданных в шаблоне теста.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S**-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. Если набор количественный, то в соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК/РНК мишени.

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа: Ct(Cp) для всех каналов (Мультиплекс)** для версии программы v.7.5. и выше).
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый (Ct)**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
 - **Критерий положительного результата ПЦР**, если он указан во вкладыше к набору реагентов.
 - **Threshold StD на участке линейного фитирования**, если он указан во вкладыше к набору реагентов.
 - **Критерии достоверности результата**, если они указаны во вкладыше к набору реагентов. В этом случае поставить галочку и указать **нижнюю границу/порог положительного результата и верхнюю границу/порог нормализации данных**.
 - **Нормализация данных**, если она указана во вкладыше к набору реагентов (по умолчанию – не использовать – галочка в соответствующем окне отсутствует).
Нажать кнопку **Применить**.
5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки Ф (отжать кнопку)**, если это указано во вкладыше к набору реагентов.

6. Если пороговая линия устанавливалась с помощью величины **Threshold StD на участке линейного флуоресценции**, то для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить пороговую линию (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов.
7. Если во вкладыше к набору реагентов указана установка пороговой линии вручную, то установить пороговую линию поочередно для каждого из каналов (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить пороговую линию (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где соблюдаются требования вкладыша, кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
8. Для дальнейшей работы с данными в формате Microsoft® Excel можно скопировать результаты значений *C_t* для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета в виде файла Word нажать кнопку **Отчет по результатам анализа** . Далее выбрать галочками параметры, необходимые для отображения в отчете, нажать кнопку **Сохранить отчет как...** (рекомендуется сохранять отчет в папку **Мои документы**), выбрать формат «*MS Word/Acrobat Reader/JPEG/HTML» и папку для сохранения, присвоить имя файлу и нажать кнопку **Сохранить**.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК/РНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору

реагентов.

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

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы RealTime PCR v.7.3 и выше

Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (кривые при этом имеют S-образный вид в линейной шкале)	Установить линию порога на уровне, указанном во вкладыше
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Повторная амплификация для данного образца

РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРОМ CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)

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

Прибор CFX96 относится к приборам планшетного типа. При работе с данными приборами детекция флуоресценции осуществляется через крышку пробирки. 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).

Программирование амплификатора

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. Для этого можно создать шаблон для проведения теста и пользоваться готовым шаблоном при последующих постановках.

Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
2. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации и объем реакционной смеси **Sample Volume**, указанные в инструкции по применению набора реагентов.

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

1	50,0	C for 15:00
2	95,0	C for 15:00
3	95,0	C for 0:10
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	60,0	C for 0:20
		Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
5	GOTO 3	,44 more times
		END

3. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**,

ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

4. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры, указанные в инструкции по применению набора реагентов и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов, кроме калибраторов (если они есть). Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

Для калибраторов **K1** и **K2** для всех каналов обозначить **Sample type – Standard** и указать их концентрацию в поле **Concentration** в соответствии с вкладышем к набору реагентов (если набор количественный), при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

5. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
6. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

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

7. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

Использование готового шаблона для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing....**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;
- в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing....**, в окне

Select Plate выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла C_t в соответствующей графе таблицы результатов. Если набор количественный, то в соответствии со значениями C_t калибраторов автоматически происходит построение калибровочного графика и расчет концентраций ДНК/РНК мишени.

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
3. Установить пороговую линию поочередно для каждого из каналов на определенном уровне (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой) в соответствии с вкладышем, прилагаемым к набору реагентов. Для этого нужно поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где соблюдаются требования вкладыша, кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
4. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов и, если набор количественный, концентрации калибраторов.
5. Для дальнейшей работы с данными в формате Microsoft® Excel можно скопировать результаты значений C_t для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета о постановке в формате **.pdf** необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК/РНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Возможные проблемы и особенности анализа результатов при использовании программы Bio-Rad CFX Manager

Возможные проблемы	Признаки	Способ устранения
Неправильно установлен уровень порога	Линия порога проходит вместе с отрицательными образцами или выше некоторых или всех положительных кривых (имеют S-образный вид в линейной шкале)	Установить линию порога на уровне, указанном во вкладыше
Перед запуском эксперимента не сброшены капли со стенок пробирок	Появление отрицательных или положительных «ступеней» в кривых накопления флуоресценции	Повторная амплификация для данного образца

РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ С ПРИБОРОМ SmartCycler II (CERHEID, США)

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

Программирование амплификатора

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

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

2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

3. В основном меню программы выбрать **Define Protocols**. В открывшемся окне выбрать в нижнем левом углу экрана кнопку **New Protocol**, дать название протоколу и задать программу амплификации, указанную в инструкции по применению набора реагентов.

Примечание – Чтобы задать измерение флуоресцентного сигнала, необходимо щелкнуть на ячейке **Optics** нужного шага циклирования и выбрать **ON**.

4. В нижней части окна нажать кнопку **Save Protocol**.

5. Нажать кнопку **Create Run** в основном меню программы. В окне **Run Name** нужно ввести имя файла, в котором будут сохранены все данные эксперимента. В центральной части левой панели экрана нажать стрелку **Dye set** и в ниспадающем меню выбрать комбинацию красок **FCTC25**.

6. В центре экрана нажать кнопку **Add/Remove Sites** и в появившемся окне выбрать нужный протокол (программу) и ячейки, в которых будет проводиться анализ. Нажать кнопку **OK**.

7. В таблице в верхней половине окна перечислены установки анализа данного эксперимента. В этой таблице для каждого образца в столбце **Sample Type** по умолчанию указан тип образца **UNKN** (неизвестный). В колонке **Sample ID** дается название каждому образцу.

8. Запустить выполнение программы эксперимента кнопкой **Start Run** в нижней части экрана.

Анализ результатов

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора SmartCycler II. 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. Выбрать в меню **Analysis settings**. Установить уровень пороговой линии в столбце **Manual Tresh Fluor Units** в соответствии с вкладышем, прилагаемым к набору реагентов, после чего нажать кнопку **Update Analysis** в нижней части окна. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
2. В таблице результатов (окно **Results Table**) появятся значения *Ct* для каждого канала.

Интерпретация результатов

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК/РНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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