

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ

для обнаружения специфических участков РНК вируса гепатита С
в сыворотке или плазме крови человека
методом ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени

БИОТИТР-С

ОГЛАВЛЕНИЕ

Назначение	2
Принцип метода	2
Аналитические характеристики	2
Состав набора	2
Оборудование, реагенты и материалы	3
Условия хранения и эксплуатации набора	3
Пробоподготовка	4
РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «iCycler IQ5» (BioRad)	5
Общие сведения	5
Перед началом работы	5
Создание протокола расположения образцов	8
Постановка реакции амплификации	9
Создание рабочего протокола	10
Анализ и интерпретация результатов	11
РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «CFX96» (BioRad)	15
Общие сведения	15
Перед началом работы	15
Подготовка к постановке реакции	17
Постановка реакции амплификации	19
Анализ и интерпретация результатов	20
РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «ДТ96» (ДНК-технология)	24
Общие сведения	24
Перед началом работы	24
Постановка реакции амплификации	30
Анализ и интерпретация результатов	31
РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «Rotor Gene Q» (Corbett Research)	35
Общие сведения	35
Перед первым использованием	35
Постановка реакции амплификации	38
Анализ и интерпретация результатов	42

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов БИОТИТР-С предназначен для выявления РНК *Hepatitis C virus* (HCV) в сыворотке или плазме крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с регистрацией продуктов амплификации по конечной точке или в режиме реального времени.

Каждый набор рассчитан на 100 тестов, включая контрольные образцы.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип действия набора основан на использовании накопления флуоресценции от разрушения флуоресцентно-меченных зондов, определяющих специфические участки ампликонов в процессе ПЦР (оценка «ПЦР в реальном времени»).

Флуоресцентная детекция не требует открывания пробирок после проведения ПЦР и извлечения из них продуктов реакции, что значительно снижает опасность контаминации помещения и реагентов ампликонами.

Проведение ПЦР-анализа включает 2 лабораторных этапа:

1. обработка клинических проб (выделение ДНК);
2. постановка реакции ПЦР (амплификация) и детекция продуктов реакции в режиме реального времени;

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность анализа

Для идентификации РНК вируса гепатита С подобрана система праймеров, комплементарных консервативным участкам генома (5'-нетранслируемая область) среди разных генотипов вируса гепатита С (HCV). Использование внутреннего олигонуклеотидного зонда позволяет выявлять РНК HCV со 100% специфичностью анализа.

Чувствительность анализа

Чувствительность набора БИОТИТР-С составляет 10^3 геном-эквивалентов *Hepatitis C virus*, что соответствует 370 Международным единицам (МЕ) в соответствии со Вторым международным стандартом WHO РНК HCV для тестов, основанных на определении нуклеиновых кислот (NIBSC 96/798).

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора, рассчитанного на проведение анализа 100 образцов для выявления РНК возбудителя гепатита С входят 2 комплекта, содержащие готовые к применению реагенты:

- 1 - Комплект для выделения РНК.
- 2 - Комплект для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Комплект для выделения РНК (на 100 образцов)

Внимание! Выделение с помощью реактива «РНК-ЭКСПРЕСС» является принципиальным для работы с данным набором!

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Формат качественный	1. Реагент РНК-ЭКСПРЕСС 2. Положительный контрольный образец * 3. Отрицательный контрольный образец**	100 пробирок (по 200 мкл) 5 лиофилизированных пробирок 5 пробирок (по 300 мкл)
Формат количественный	1. Реагент РНК-ЭКСПРЕСС 2. Отрицательный контрольный образец** 3. Набор стандартных контрольных образцов***	100 пробирок (по 200 мкл) 5 пробирок (по 300 мкл) По 5 лиофилизированных пробирок для каждого стандарта

РНК-ЭКСПРЕСС представляет собой готовый реагент для выделения РНК из биопроб, расфасованный по 200 мкл в пробирки типа Эппендорф.

Внутренний контрольный образец (ВКО), входящий в состав реагента РНК-ЭКСПРЕСС, позволяет компенсировать ингибирование и контролировать процессы пробоподготовки и амплификации, что обеспечивает более

точное определение РНК HCV в каждом анализируемом образце. ВКО представляет собой неинфекционную защищенную РНК бактериофага MS2 (концентрация 10^5 копий РНК MS2/мл) в растворе реагента РНК-ЭКСПРЕСС.

*Положительный контрольный образец представляет собой пробу на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, несущую армированную РНК вируса гепатита С (HCV), упакованную в бактериофаг MS2, с известной концентрацией в диапазоне от 10^3 до 10^4 копий РНК HCV /мл.

**Отрицательный контрольный образец представляет собой пробу на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, не несущую фрагменты последовательности вируса гепатита С.

*** Набор стандартных контрольных образцов представляет собой 4 пробы на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, несущие армированную РНК вируса гепатита С (HCV), упакованную в бактериофаг MS2, с концентрацией - 10^3 , 10^4 , 10^5 и 10^6 копий РНК MS2/мл, соответственно.

Комплект для проведения полимеразной цепной реакции «БИОТИТР-С»

Данный комплект универсален для всех форматов набора.

Состав	Комплектация
1. Реакционная смесь* 2. Таq-полимераза..... 3. Обратная транскриптаза (200 ед/мкл)..... 4. Разбавитель..... 5. Дитиотрейтол (ДТТ)..... 6. Ингибитор рибонуклеаз (20 ед/мкл).....	1 пробирка (1300 мкл) 1 пробирка (90 мкл) 1 пробирка (25 мкл) 3 пробирки (по 2 мл) 1 пробирка (30 мкл) 1 пробирка (70 мкл)

Комплект для проведения амплификации включает готовые к применению реагенты.

*В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (2 зонда): зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор ROX, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX;
- праймеры для выявления внутреннего контроля; внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, и качество выделения РНК.

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

1 этап – выделение ДНК из биопробы

- реагент в пробирках для выделения РНК из биопроб «РНК-ЭКСПРЕСС»;
- ламинарный бокс 2 класса защиты;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8000–14000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1500–3000 об/мин (или вортекс);
- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема (5-50; 20-200; 100-1000 мкл);
- штативы для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- штатив для хранения пробирок 1,5 мл;

2 этап - проведение ПЦР-амплификации

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- микроцентрифуга-вортекс 1500-3000 об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5-50 мкл для работы с биопробами;

- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов;
- бесцветные (оптические с оптическими крышками) одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,2 мл для амплификации согласно требованиям производителя прибора;
- одноразовые наконечники до 200 мкл и до 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл для биопроб;
- штатив для пробирок 0,2 мл;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- ёмкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Комплект для пробоподготовки (выделение РНК) должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплекта при температуре до 25°C не более 1 суток.

Комплекты для проведения амплификации всех форматов должны храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 1 суток.

Срок годности набора – 6 месяцев.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

ПРОБОПОДГОТОВКА

Исследуемым материалом для анализа является плазма или сыворотка из цельной венозной крови.

1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

2 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 200 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия. Использовать гепарин строго не рекомендуется!).

Внимание! При использовании для забора крови вакуумных пробирок с ЭДТА или цитратом натрия дополнительное внесение антикоагулянта не требуется. При этом объем крови, необходимый для исследования, заранее маркируется на пробирке в соответствии с количеством антикоагулянта, помещенного в пробирку.

Неохлажденные пробы хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; *не замораживать!*

1. В пробирку типа «Эппендорф» внести 1 мл цельной крови. Если кровь расслоилась в процессе хранения, то перед внесением ее необходимо перемешать до однородности.

2. Закрыть пробирку и центрифугировать со скоростью 3000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы. На поверхности осадка форменных элементов расположен тонкий слой лейкоцитов.

3. Аккуратно, не захватив лейкоциты, перенести плазму в чистую пробирку.

Внимание! Сыворотку или плазму отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 2-6 часов. В случае необходимости сохранения образцов для исследования сыворотку или плазму хранить при температуре +2...+4°C не более 72-х часов, для более длительного хранения заморозить при -20°C. Замороженная сыворотка или плазма может храниться в течение 1 месяца.

2. Выделение РНК

1. Промаркировать пробирки с реагентом РНК-ЭКСПРЕСС и расположить их соответствующим образом в штативе, включая пробирки для образцов из комплекта для пробоподготовки:

- отрицательного контрольного образца (для всех форматов),
- стандартных контрольных образцов (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) в случае использования формата «количественный»,
- положительного контрольного образца в случае использования формата «качественный».

2. Добавить в пробирки с лиофилизированными стандартами или положительным контролем в количестве, необходимом для одной постановки, 200 мкл деионизованной воды. Оставить для растворения при комнатной температуре на 30 минут. После этого тщательно перемешать на вортексе в течение 1 минуты и сбросить капли с крышек.
3. Свежую или полностью размороженную сыворотку или плазму крови тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд.
4. Осадить капли на микроцентрифуге.
5. Внести 200 мкл сыворотки или плазмы крови в заранее приготовленную пробирку с реагентом РНК-ЭКСПРЕСС.
5. Внести по 200 мкл отрицательного, положительного или стандартных контрольных образцов (в зависимости от используемого формата набора) из комплекта для пробоподготовки в соответствующие пробирки.
6. Тщательно перемешать импульсным вортексированием 30 секунд.
7. Осадить капли на микроцентрифуге.
8. Поместить в заранее прогретый до 90°C термостат и инкубировать при 90°C в течение 10 минут.
9. Центрифугировать при 12-13 тыс.об./мин. при комнатной температуре в течение 1 минуты.
10. Супернатант использовать в качестве исследуемого образца РНК для постановки амплификации.

Полученный раствор РНК хранению не подлежит! ПЦР анализ должен быть проведен в течение 20-30 минут после выделения РНК!

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТА В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «iCYCLER IQ5» (BIORAD)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «iCycler IQ5» представляет собой программируемый термостат (амплификатор), сопряженный с оптической системой детекции флуоресцентного сигнала по 5 каналам через крышки пробирок. Система позволяет проводить ПЦР и регистрировать сигнал от образцов по заданным каналам в каждом цикле. По окончании реакции управляющая программа строит кривые накопления фонового сигнала от каждого образца в каждом из задействованных каналов, по которым в дальнейшем и производится анализ результатов. Для работы с набором БИОТИТР-С используются каналы ROX (специфический сигнал) и HEX (сигнал внутреннего контроля).

В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с набором БИОТИТР-С. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции по использованию прибора или к его изготовителям.

2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

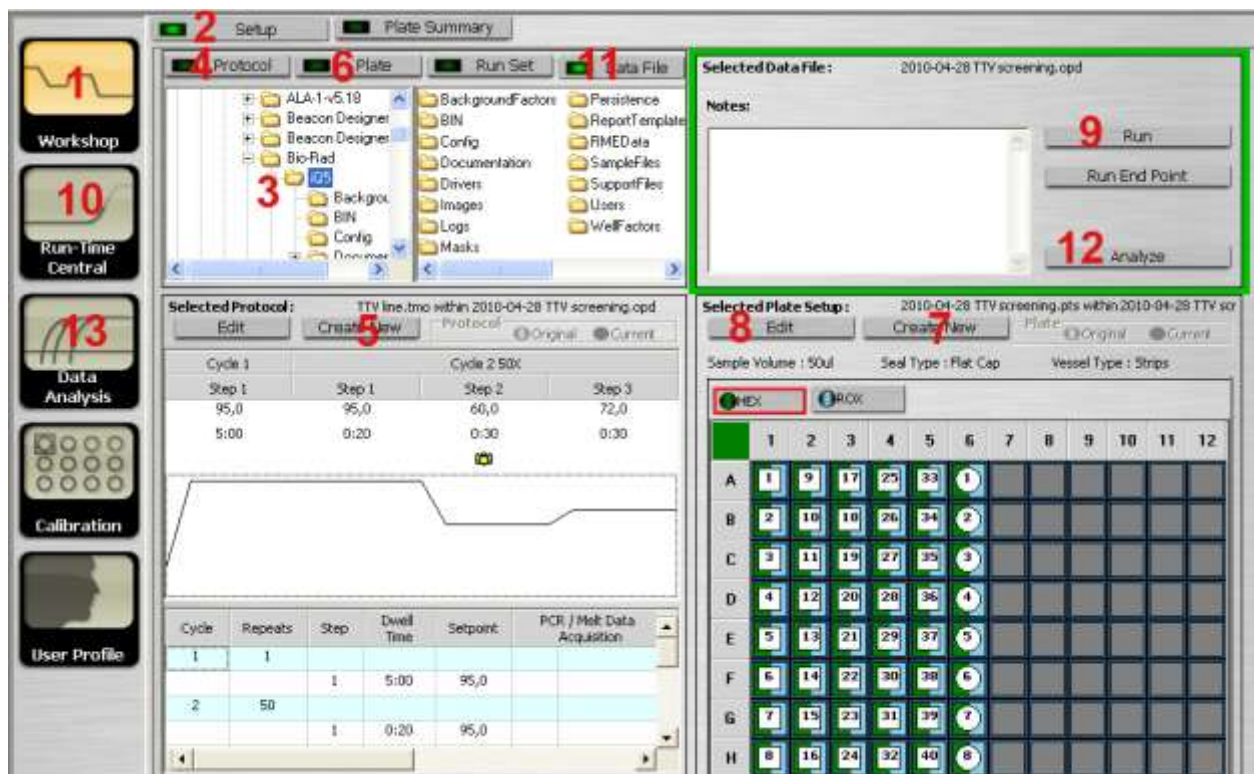
Перед первым использованием прибора с набором БИОТИТР-С необходимо выполнить следующие действия.

2.1. Калибровка прибора по флуорофорам ROX и HEX. Необходимо проводить с использованием пробирок того типа и того изготовителя, которые будут в дальнейшем использованы для постановки анализов при помощи набора БИОТИТР-С (см. рекомендации изготовителя прибора). Калибровка проводится при помощи реактивов, рекомендуемых производителем прибора в соответствии с инструкцией к прибору и рекомендациями его изготовителей. Частота калибровок определяется рекомендациями производителя прибора. Объем калибровочных смесей, вносимых в каждую пробирку должен составлять 50 мкл. Для полного соответствия условиям использования набора БИОТИТР-С в каждую пробирку с калибровочной смесью следует внести по 20 мкл минерального масла и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18...+ 25°C) на микроцентрифуге-вортексе (если используются

плашки или стрипованные пробирки – на предназначенной для этого центрифуге; значение угловой скорости (об/мин) в этом случае может отличаться от указанного).

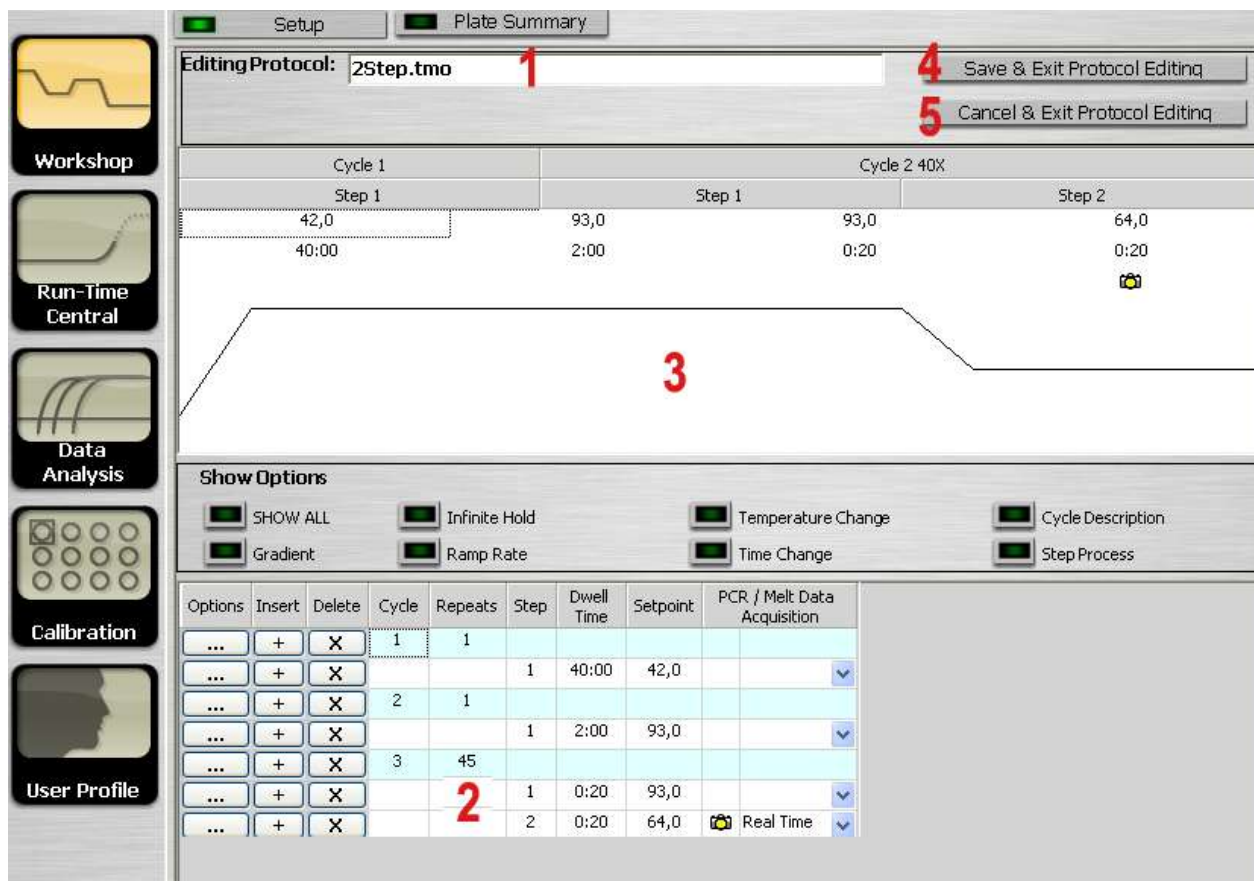
2.2. Создание шаблона протокола амплификации.

2.2.1. Запустить управляющую программу. Общий вид ее главного окна представлен на рисунке:







Выбрать раздел **Workshop** (1), нажать на кнопку **Setup** (2). В окне (3) выбрать папку, куда будут сохранены шаблоны.

2.2.2. Нажать кнопку **Protocol** (4). При этом активизируется (выделится зеленым) рамка **Selected Protocol**. Нажать кнопку **Create New** (5) и программа перейдет в окно задания нового протокола.



2.2.3. Изначально в окне будут содержаться сведения о протоколе по умолчанию. В поле (1) следует ввести имя создаваемого протокола. В таблице (2) следует внести изменения, так чтобы протокол принял следующий вид:

Options	Insert	Delete	Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint	PCR / Melt Data Acquisition
...	+	X	1	1				
...	+	X			1	40:00	42,0	▼
...	+	X	2	1				
...	+	X			1	2:00	93,0	▼
...	+	X	3	45				
...	+	X			1	0:20	93,0	▼
...	+	X			2	0:20	64,0	Real Time ▼

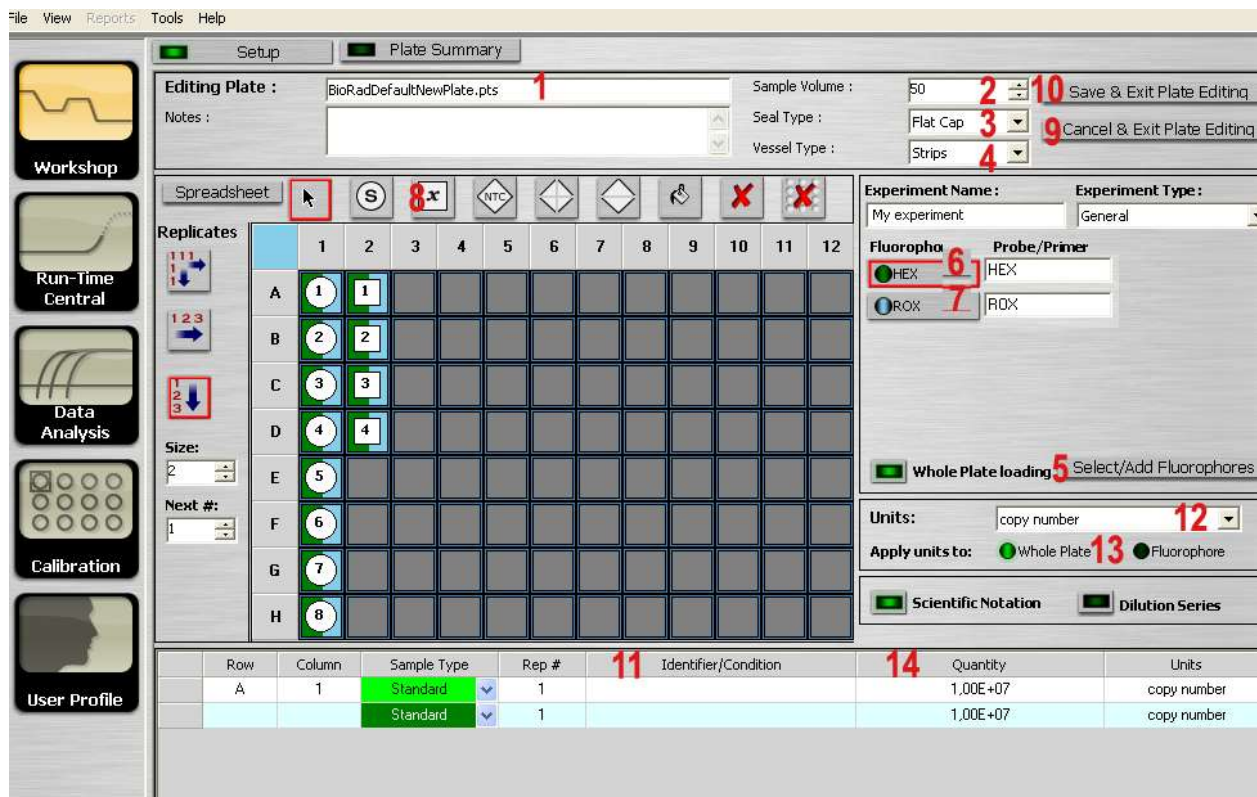
Шаг может быть удален кнопкой  или добавлен кнопками  и  (последний вариант предоставляет более широкие возможности). Кнопка  позволяет выбрать действие в шаге (пустая ячейка в столбце **PCR/Melt Data Acquisition** соответствует значению «none»). Для добавления/изменения численного значения в ячейке необходимо выбрать ячейку и ввести значение с клавиатуры. В поле (3) выводится программа амплификации в графическом виде.

Чтобы сохранить протокол и выйти в главное окно программы, необходимо нажать кнопку (4). Для выхода из режима изменения без сохранения протокола необходимо нажать кнопку (5).

2.3. Создание шаблона расположения образцов.

2.3.1. В главном окне программы (рис. в п. 2.2.1.) выбрать раздел **Workshop** (1), нажать на кнопку **Setup** (2). В окне (3) выбрать папку, куда будут сохранены шаблоны.

2.3.2. Нажать кнопку **Plate** (6). При этом активизируется (выделится зеленым) рамка **Selected Plate Setup**. Нажать кнопку **Create New** (7) и программа перейдет в окно задания настроек образцов.

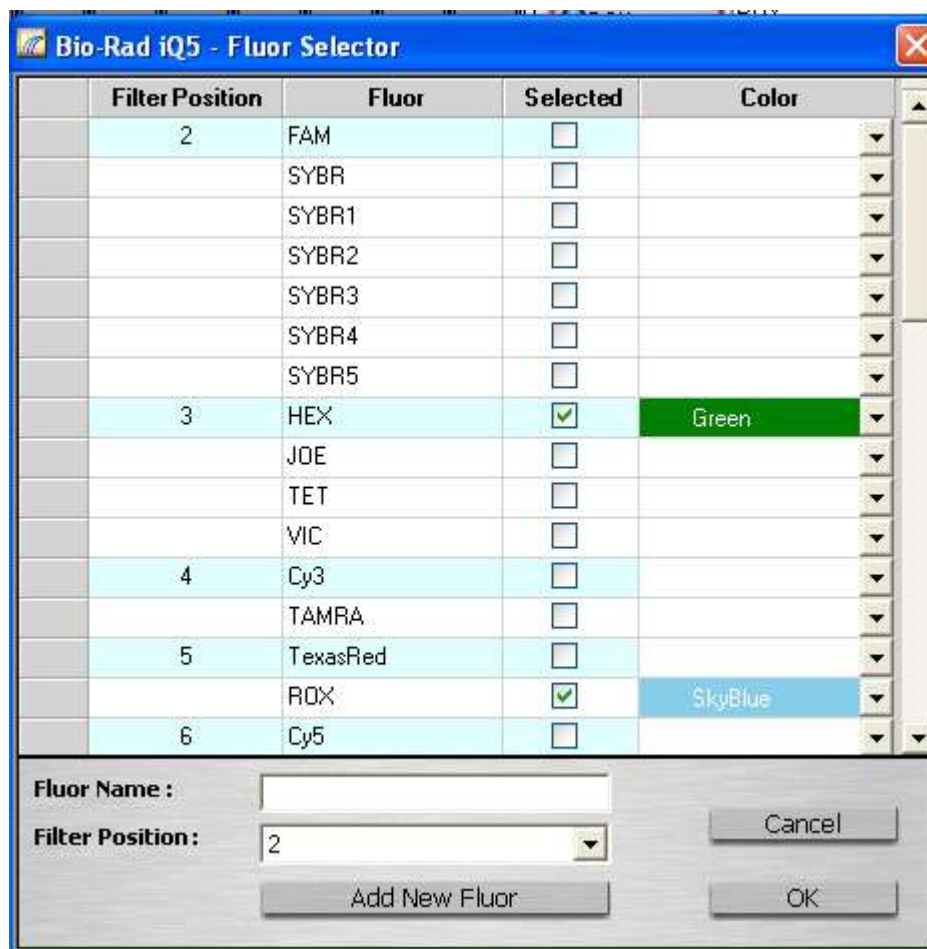


Row	Column	Sample Type	Rep. #	11 Identifier/Condition	14 Quantity	Units
A	1	Standard	1		1,00E+07	copy number
		Standard	1		1,00E+07	copy number

2.3.3. Изначально в окне будут содержаться сведения о шаблоне по умолчанию.

- В поле (1) следует ввести имя создаваемого шаблона.
- В поле (2) задать объем пробы в мкл - 50.

- В поле (3) задать тип используемых оптических крышек.
- В поле (4) задать тип используемых пробирок.
- Нажать кнопку (5) для задания списка флуорофоров. В появившемся окне



поставить флажки напротив HEX и ROX и выбрать цвета для них. Нажать Ok для выхода с учетом изменений или Cancel для выхода без учета.

- Нажать кнопку (6), затем (8) и затем нажать на одну из ячеек в схеме расположения образцов.
- Нажать кнопку (7), затем (8) и затем нажать на ту же ячейку в схеме расположения образцов.
- Чтобы сохранить шаблон и выйти в главное окно программы, необходимо нажать кнопку (10). Для выхода из режима изменения без сохранения протокола необходимо нажать кнопку (9).

3. СОЗДАНИЕ ПРОТОКОЛА РАСПОЛОЖЕНИЯ ОБРАЗЦОВ

3.1. Запустить управляющую программу.

3.2. В главном окне программы (рис. в п. 2.2.1.) выбрать раздел **Workshop** (1), нажать на кнопку **Setup** (2). В окне (3) выбрать папку, где был сохранен шаблон расположения образцов, нажать кнопку **Plate** (6), выбрать шаблон, нажать кнопку **Edit** (8) и перейти в окно редактирования расположения образцов (рис. в п. 2.3.2).

3.3. Отредактировать протокол расположения образцов:

- В поле (1) задать название протокола.
- Используя следующие кнопки, задать типы образцов в ячейках прибора и каналы, по которым будет производиться их считывание:



Примечание: для простоты можно задать образцы лишь для одного канала, а затем использовать инструмент «Заливка»:



Другие кнопки для редактирования протокола:



- удаление выбранного канала считывания для образца;



- удаление образца из протокола;



- выделение образца, вывод и редактирование его свойств.

- Для всех анализируемых образцов в столбце (11) можно ввести их названия.
- При проведении количественного анализа с использованием не менее чем 2 стандартных образцов, необходимо в списке (12) выбрать единицы измерения концентрации, указать в (13) их применимость для отдельно взятого флуорофора, в столбце (14) указать их концентрации.
- Чтобы сохранить шаблон и выйти в главное окно программы, необходимо нажать кнопку (10). Для выхода из режима изменения без сохранения протокола необходимо нажать кнопку (9).

4. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке бесцветные пробирки с оптическими крышками, соответствующие рекомендациям производителя прибора, вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается!

4.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирки с Taq-полимеразой, обратной транскриптазой и ингибитором рибонуклеаз в ледяную баню). Пробирки с полностью размороженным содержимым тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

Внимание! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

4.3. Приготовить рабочую смесь из расчета на 1 пробу

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	43
Реакционная смесь	12
Дитиотрейтол (ДТТ)	0,15
Ингибитор рибонуклеаз	0,5
Обратная транскриптаза	0,2
Taq-полимераза	0,8

Тщательно перемешать смесь пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или импульсным вортексированием 15-20 раз.

4.4. Внести в приготовленные пробирки по 55 мкл полученной рабочей смеси.

4.5. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 20 мкл:

- в пробирку отрицательного контроля ПЦР – разбавитель;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы РНК;
- в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки стандартных контрольных образцов (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) для количественного определения – соответствующие образцы, прошедшие процедуру выделения;

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

***Внимание!!** ПЦР анализ должен быть проведен в течение 20-30 минут после выделения РНК! Раствор не хранится!*

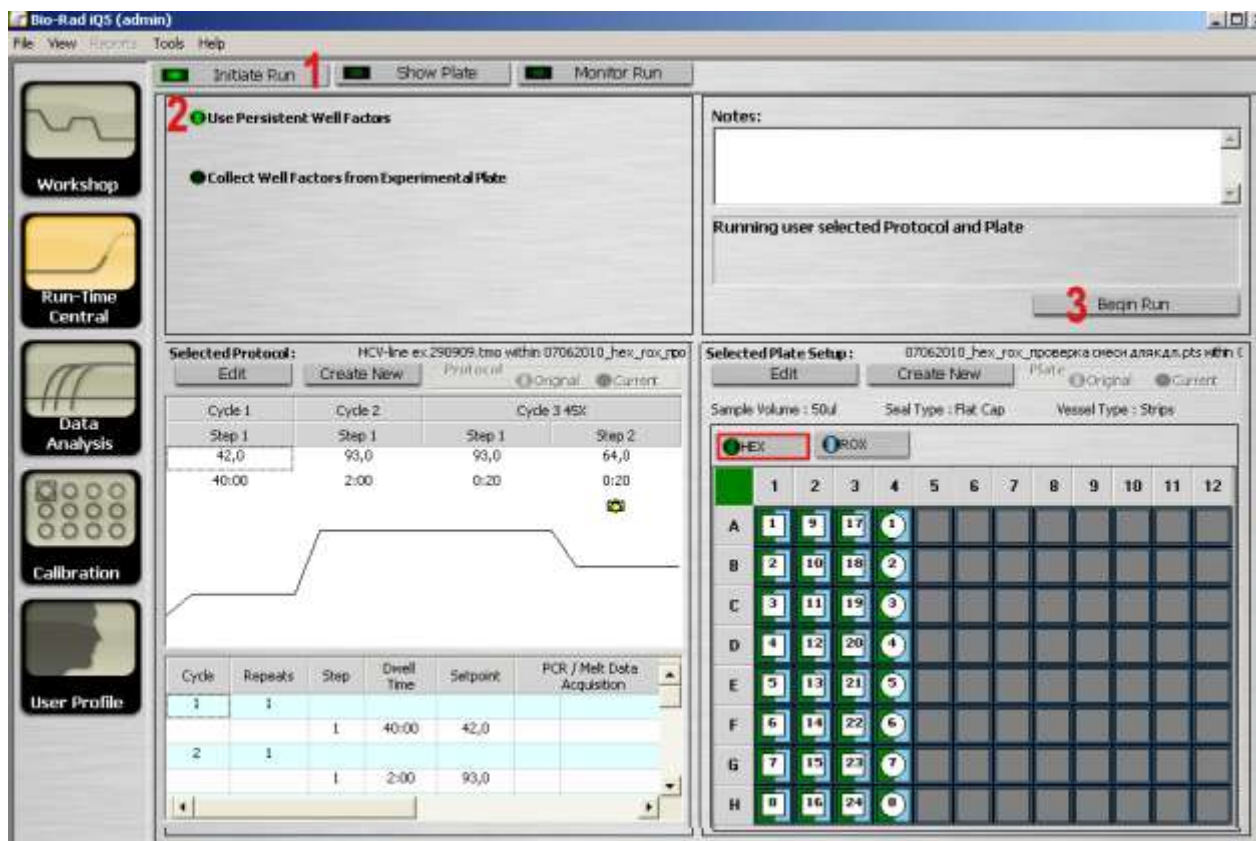
4.6. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе (если используются плашки или стрипованные пробирки – на предназначенной для этого центрифуге; значение угловой скорости (об/мин) в этом случае может отличаться от указанного).

5. СОЗДАНИЕ РАБОЧЕГО ПРОТОКОЛА

5.1. Перенести пробирки в систему для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени в точном соответствии заданным ранее протоколом расположения образцов (см. инструкцию к прибору).

5.2. В главном окне управляющей программы (рис. в п. 2.2.1.)

- Выбрать раздел (1), нажать кнопку (2).
- Нажать кнопку **Protocol** (4), выбрать заданный ранее протокол амплификации.
- Нажать кнопку **Plate** (6), выбрать протокол расположения образцов.
- Нажать кнопку (9) или выбрать раздел (10) и перейти в окно запуска амплификации и измерений.



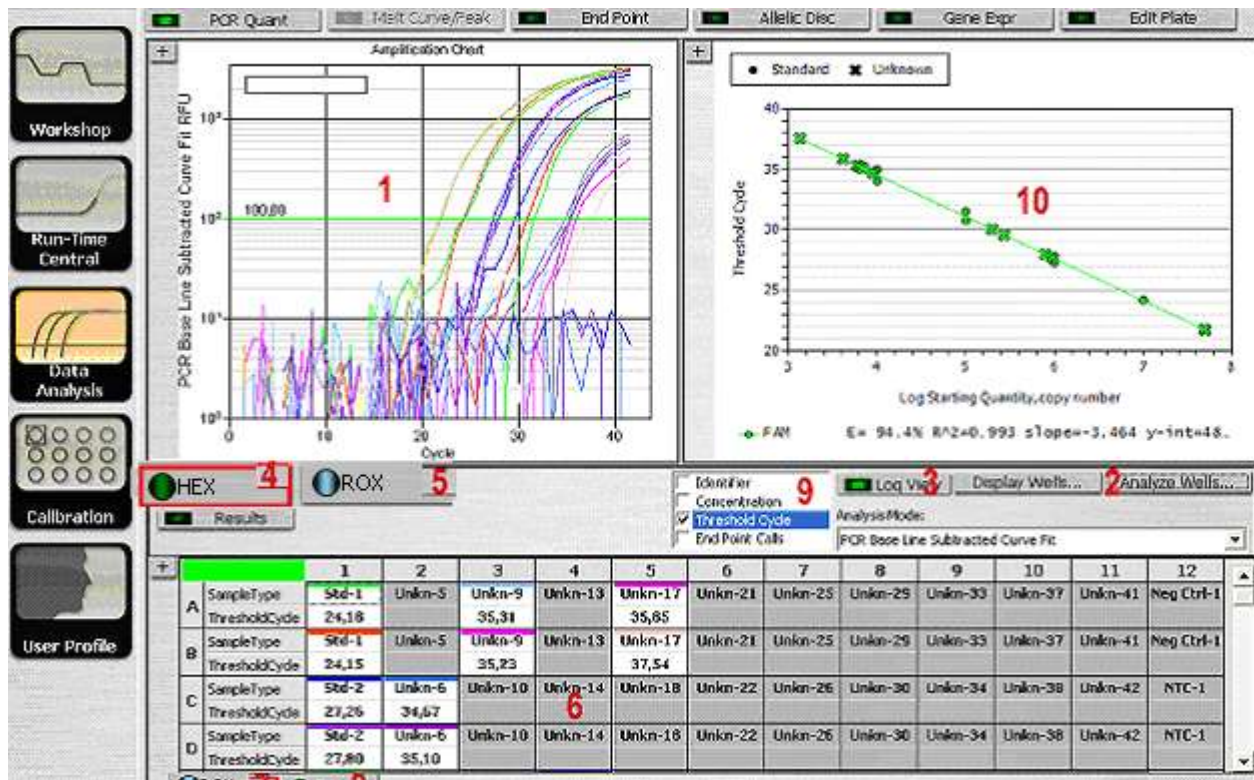
5.3. Нажать кнопку **Initiate Run** (1), в окне (2) выбрать режим **Use persistent Well Factors**, нажать кнопку **Begin Run** (3). Прибор предложит задать имя файла, в который будут сохраняться результаты, а затем начнет исполнение протокола амплификации.

6. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

7. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

7.1. В главном окне программы (рис. в п. 2.2.1.) выбрать раздел **Workshop** (1), нажать кнопку **Setup** (2), нажать **Data File** (11), выбрать подлежащий анализу файл и нажать кнопку **Analyze** (12). Откроется окно анализа кривых накопления фонового сигнала.

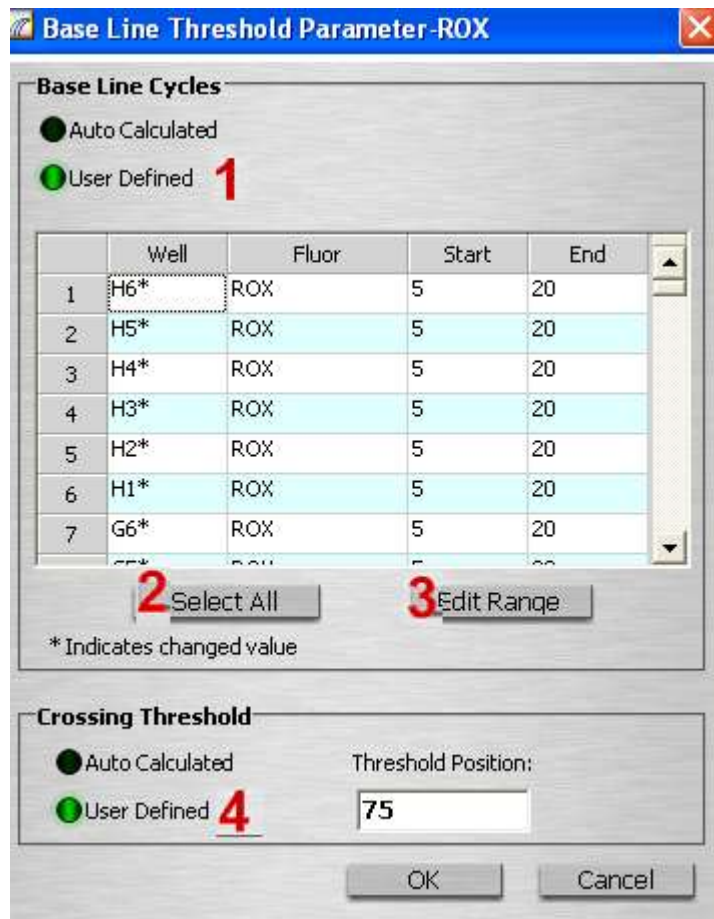


7.2. Структура окна анализа

- (1) – окно отображения кривых накопления флуоресцентного сигнала;
- (2) – кнопка **Analyze Wells** – с ее помощью задается диапазон анализируемых ячеек;
- (3) – кнопка, задающая вид выводимых в окне (1) кривых (линейные или логарифмические координаты);
- (4), (5) – кнопки выбора отображаемых в окне (1) каналов;
- (6) – окно вывода текстовой информации по образцам;
- (7), (8) – кнопки выбора отображаемого в окне (6) канала;
- (9) – окно выбора отображаемой в окне (6) информации;
- (10) – окно количественного анализа. Появляется только при наличии в постановке должным образом прописанных стандартных образцов;

7.3. Нажать кнопку (2) и выбрать анализируемые ячейки.

7.4. Кнопками (4) и (5) выставить активным (обведенным зеленой рамочкой) только канал ROX. Щёлкнуть по окну (1) правой кнопкой мыши, выбрать в появившемся меню пункт **BaseLine Threshold**



Нажав кнопки (1), (2) и (3), выставить для базовой линии (**Base Line Cycles**) циклы с 5 (start cycle) по 20(ending cycle). Внимание. Для пересечения с пороговой линией (**Crossing Threshold**) в поле **Threshold Position**, нажав кнопку (4), указать значение 75.

7.5. Повторить действия из пункта 6.4 для канала HEX, выставив значение **Threshold Position 250**, выставить для базовой линии (**Base Line Cycles**) циклы с 5 (start cycle) по 15(ending cycle) .

Внимание! Приведенные значения подходят к приборам данного типа в большинстве случаев. Однако для отдельных приборов или после перекалибровки шкала интенсивности может измениться. Для проверки адекватности следует перейти в логарифмический режим отображения данных. В этих условиях правильному положению *Threshold* соответствует середина линейного участка подъема кривой.

7.6. По завершении этих действий программа автоматически рассчитает точки пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с линией *Threshold* (*Threshold Cycle*, или *Ct*).

Примечание. Программа может присваивать некоторым кривым очень бледные оттенки или вовсе выводить их белым цветом. Переназначить цвета кривых можно в окне **Define Trace Style**. Для его вызова необходимо кликнуть в окне (1)- рис. в п. 6.1. правой клавишей мыши и в появившемся меню выбрать одноименный пункт.

7.7. Выбрать пункт «*Threshold Cycle*» в окне (5) (рис. п.6.1.). После этого программа покажет *Ct* для каждого образца.

7.8. Чтобы проанализировать каждый образец в отдельности, кнопками (4) и (5) (рис. п.6.1.) выбрать интересующий канал, затем нажать кнопку (2). В появившемся окне деактивировать все лишние лунки и оставить только интересующие (обведены желтой рамочкой). Нажать **Apply** или **Ok**.

7.9. Вывести полученные после обработки данные в отчет. Для этого:

- Сделать активными одновременно кнопки **ROX**(4) и **HEX** (5) в окне анализа (п. 6.1.)
- Выбрать меню Reports и нажать на него.



- В открывшемся окне выбрать **Std Curve data Only – Landscape** в случае качественного анализа, либо один из трех вариантов **PCR Quant...** (в зависимости от требуемого уровня детализации) в случае количественного анализа.
- Отчет следует сохранить (кнопка **Save to File**) и, при необходимости, распечатать (кнопка **Print**).

7.10. Интерпретация результатов качественного анализ производится согласно таблице:

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct FAM – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор FAM) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

N/A – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

	Ct ROX(FAM)	Ct HEX	Результат
К+ выделения	<45	<40	Выделение и специфическая реакция прошли.
К+ ПЦР	<45	любой	Специфическая реакция прошла.
К- ПЦР	НЗ	НЗ	Специфическая контаминация и контаминация внутренним контролем отсутствует.
	<45	НЗ	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ	<40	Контаминация внутренним контролем. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К- выделения	НЗ	<40	Специфическая контаминация отсутствует.
	НЗ	>40	Ингибирование или недостаточное выделение РНК
	<45	<40	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
Анализируемый образец	<45	<40	ПРИСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	НЗ	<40	ОТСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	<НЗ или НЗ	НЗ или >40	Ингибирование или недостаточное выделение РНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

7.11. Интерпретация результатов количественного анализа:

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

N/A – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

	Содержание РНК	Ct HEX	Результат
Исследуемый образец	≥ чувствит.	до 40	Присутствие РНК возбудителя в указанной концентрации
		после 40	Присутствие РНК возбудителя, конкуренция между системами спецификации и внутреннего контроля. Перестановка не требуется
	< чувствит.	до 40	Сомнительный результат, возможна контаминация. Требуется повтор анализа данного образца.
	N/A	до 40	Отсутствие РНК возбудителя
после 40		Ингибирование. Требуется перевыделение и повтор анализа данного образца.	
Отрицательный контрольный образец ПЦР	N/A	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР отсутствует
	до 45	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР. Требуется принятие антиконтаминационных мер и повтор анализа.
Отрицательный контрольный образец выделения	N/A	до 40	Специфическая контаминация отсутствует
	до 45	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР или выделения. Требуется принятие антиконтаминационных мер и повтор анализа, начиная с этапа выделения.

Внимание! Надежными можно считать численные значения только для тех образцов, значения Ct для которых лежат между максимальным и минимальным значениями Ct для стандартных образцов!

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТА В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «CFX96» (BIORAD)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «CFX96» представляет собой программируемый термостат (амплификатор), сопряженный с оптической системой детекции флуоресцентного сигнала по 6 каналам (5 различных флуорофоров + 1 канал для FRET-зондов) через крышки пробирок. Система позволяет проводить ПЦР и регистрировать сигнал от образцов по заданным каналам в каждом цикле. В ходе реакции управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала от каждого образца в каждом из задействованных каналов, по которым в дальнейшем и производится анализ результатов. Для работы с наборами БИОТИТР-С используются каналы ROX (специфический сигнал) и HEX (сигнал внутреннего контроля).

В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с наборами БИОТИТР-С. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции производителя прибора.

2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

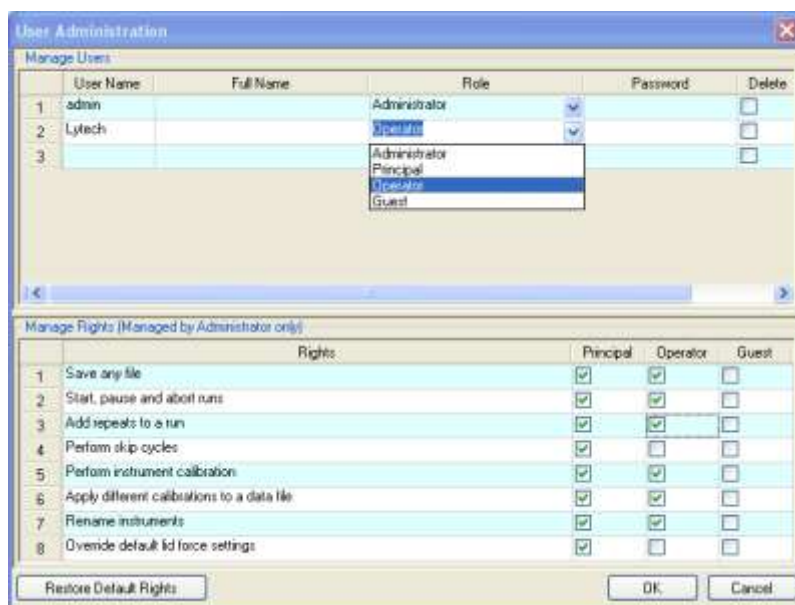
Перед первым использованием прибора с наборами БИОТИТР-С необходимо выполнить следующие действия:

2.1. Добавление пользователей. По умолчанию при установке программы устанавливается протокол пользователь «Admin», полномочия которого предполагают доступ ко всем функциям. Чтобы снизить вероятность ошибки, неправомерного изменения настроек, а также разделить папки различных операторов, можно задать дополнительных пользователей. Добавление пользователей проводится только пользователем, имеющим полномочия администратора.


2.1.1. Выбрать в меню **User** пункт **User Administration...**



2.1.2. В окне **User Administration** в столбце **User Name** новой строки ввести имя пользователя. В столбце **Role** выбрать уровень полномочий (для оператора рекомендуется Operator – полномочия можно просмотреть и, при необходимости, отредактировать в нижней части окна). Можно указать полное имя оператора в столбце **Full Name** и задать пароль в столбце **Password**. Для принятия введенных данных нажать **Ok**. Для нового пользователя автоматически будет создана своя папка.




2.1.3. Окно смены пользователя можно вызвать либо выбрав пункт **Select User** в меню **User**,

либо нажав кнопку  в основном окне управляющей программы (программа также начнёт выдавать это окно при загрузке). В появившемся окне следует выбрать пользователя из списка и, при необходимости, ввести пароль.



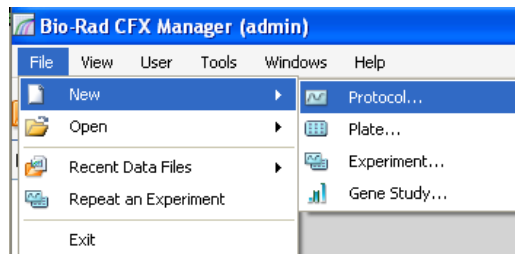
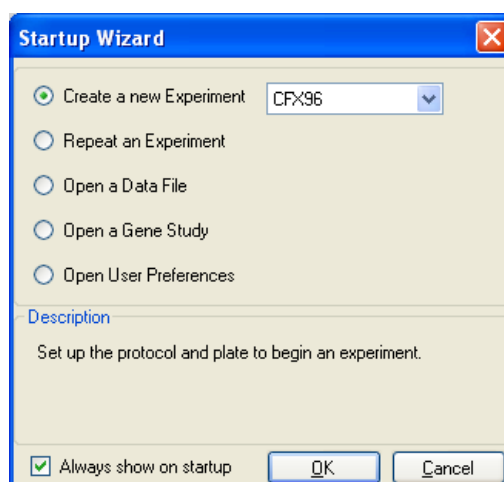
2.2. Создание протокола амплификации.

2.2.1. При запуске программы появляется окно выбора основных операций – **Startup Wizard**. Следует отметить верхнюю позицию – Создать новый эксперимент - **Create a new Experiment** и нажать кнопку **Ok**. В появившемся окне **Experiment Setup** выбрать вкладку **Protocol** и в ней нажать **Create New...** После этого откроется окно **Protocol Editor**.

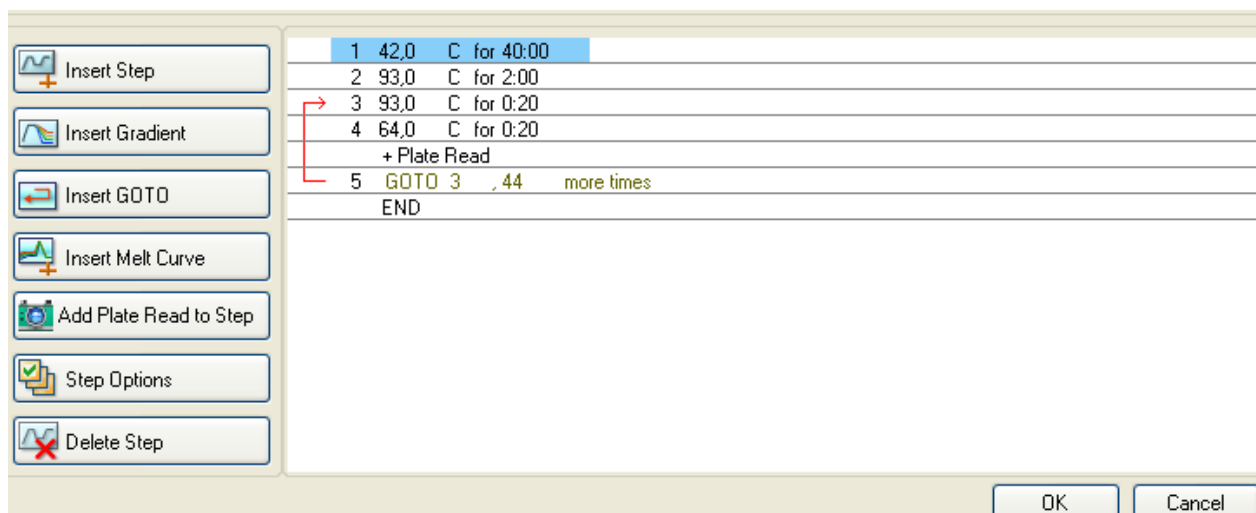
Окно **Protocol Editor** можно также вызвать кнопкой  на панели задач главного окна,



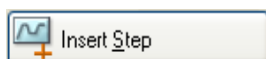
либо меню **File**, подменю **New**, пункт **Protocol...**



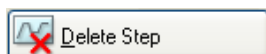
2.2.2. Создать протокол амплификации, соответствующий представленному на рисунке



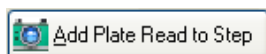
используя следующие клавиши:



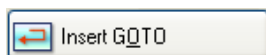
- добавляет шаг после текущего, если в поле **Insert Step** выбрано **After** и перед текущим, если в поле **Insert Step** выбрано **Before**



- удаляет текущий шаг



- добавляет в текущий шаг считывание флуоресцентного сигнала (программа сама определяет требуемое ей на данную операцию время)



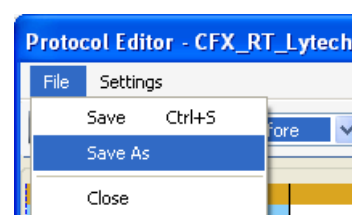
- добавляет возврат к шагу, начинающему цикл. В этом шаге указываются следующие значения:

Goto 3 , - номер шага, являющегося первым в цикле

44 more times - число возвратов (указывается значение на 1 меньше числа циклов в протоколе; для 45 циклов будет 44 возврат).

Значения могут редактироваться как в текстовом поле, так и на графике. Для изменения следует выделить значение и ввести требуемое.

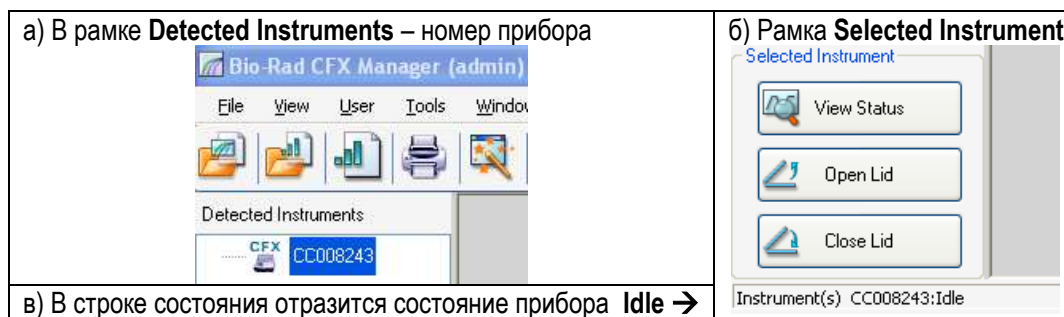
2.2.3. Для сохранения протокола следует выбрать в меню File пункт Save As. Программа предложит ввести имя протокола и сохранит его по умолчанию в папке текущего пользователя.



3. ПОДГОТОВКА К ПОСТАНОВКЕ РЕАКЦИИ


3.1. Включить прибор. Дождаться завершения его самотестирования (подробнее см. инструкцию производителя прибора).

3.2. Запустить управляющую программу. Дождаться окончания процедуры установления связи с прибором. При этом в левой части главного окна программы появятся:



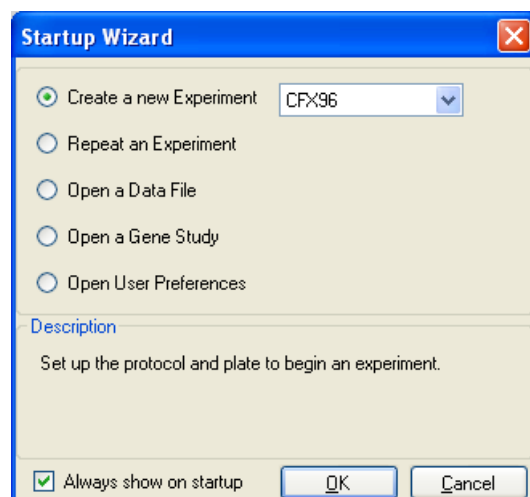
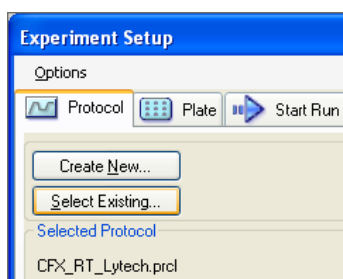
3.3. Запустить окно **Experiment Setup** любым из следующих способов:

а) В окне **Startup Wizard** выбрать пункт «Create a new Experiment» и нажать кнопку **OK**.

б) Нажать кнопку  в главном окне программы.

3.4. Во вкладке Protocol нажать кнопку **Select Existing...** и выбрать созданный в п. 2.2. протокол.

3.5. Нажать **Next>>** или выбрать вкладку **Plate**.



3.6. Если схема расположения образцов уже существует в виде файла, то её можно загрузить, нажав **Select Existing...** и, при необходимости, отредактировать. Для перехода к окну редактирования



(Plate Editor) следует нажать **Edit Selected...**. Для создания новой схемы нажать **Create New...**. При этом программа также перейдёт в окно Plate Editor.

3.7. Создание и редактирование схемы расположения образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Std HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX
B	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Std HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX
C	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Std HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX
D	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX
E	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Neg HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX
F	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Neg HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX
G	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX		Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX
H	Unk HEX ROX	Std HEX ROX		Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX	Unk HEX ROX

Select Fluorophores ...

Sample Type: Standard

Load: HEX, ROX

Target Name: <none>

Load:

Sample Name: <none>

Load:

Replicate #: 1

Concentration: 1,00E+06

Buttons: Experiment Settings..., Clear Replicate #, Clear Wells

3.7.1. Нажать кнопку **Select Fluorophores...** В списке должны быть отмечены только флуорофоры ROX и HEX.

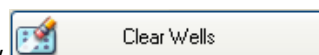
3.7.2. Выделить все лунки, в которых будут располагаться исследуемые образцы (это удобно делать с нажатой клавишей **Ctrl**). Установить для них тип образцов **Unknown**, затем отметить флуорофоры ROX и HEX.

3.7.3. Выделить расположения положительных контрольных образцов. Установить для них тип образцов **Positive Control**, затем отметить флуорофоры ROX и HEX.

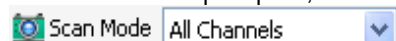
3.7.4. Выделить расположения отрицательных контрольных образцов. Установить для них тип образцов **Negative Control**, затем отметить флуорофоры ROX и HEX.

3.7.5. При количественном анализе выделить расположения стандартных образцов (это удобно делать с нажатой клавишей **Ctrl**). Установить для них тип образцов **Standard**, затем отметить флуорофор ROX и HEX. Задать концентрации этих образцов: указать численное значение в графе Concentration, затем отметить галочкой load.

3.7.6. Для удаления образцов их надо выделить и нажать кнопку



3.7.7. Проверить, чтобы был выбран режим сканирования по всем каналам



3.8. В окне **Experiment Setup** нажать **Next>>** или выбрать вкладку **Start Run**.

4. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке бесцветные пробирки с оптическими крышками, соответствующие рекомендациям производителя прибора, вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается!

4.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирки с Taq-полимеразой, обратной транскриптазой и ингибитором рибонуклеаз в ледяную баню). Пробирки с полностью размороженным содержимым тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

Внимание! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

4.3. Приготовить рабочую смесь из расчета на 1 пробу

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	43
Реакционная смесь	12
Дитиотрейтол (ДТТ)	0,15
Ингибитор рибонуклеаз	0,5
Обратная транскриптаза	0,2
Taq-полимераза	0,8

Тщательно перемешать смесь пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или импульсным вортексированием 15-20 раз.

4.4. Внести в приготовленные пробирки по 55 мкл полученной рабочей смеси.


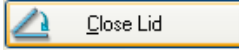
4.5. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 20 мкл:

- в пробирку отрицательного контроля ПЦР – разбавитель;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы РНК;
- в пробирку положительного контрольного образца - положительный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки стандартных контрольных образцов (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶) для количественного определения – соответствующие образцы, прошедшие процедуру выделения;

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

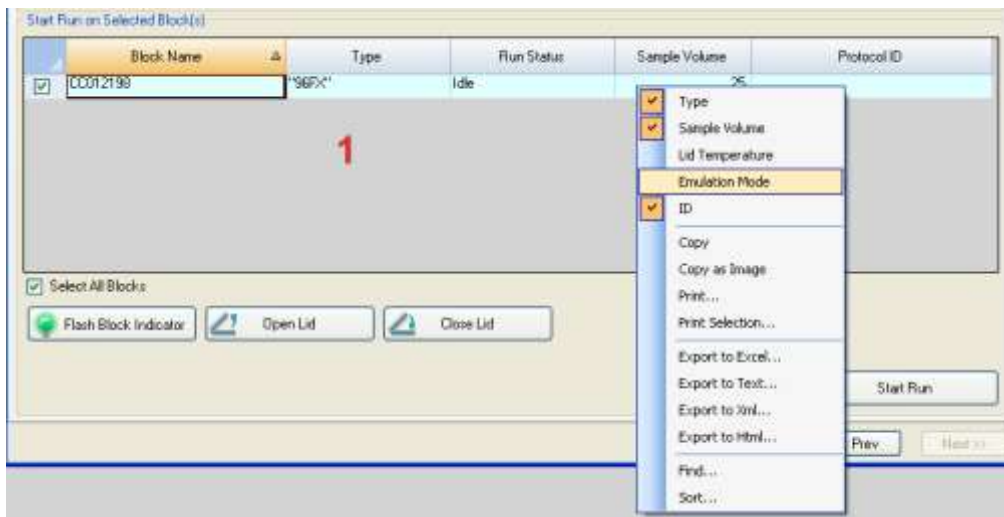
Внимание!! ПЦР анализ должен быть проведен в течение 20-30 минут после выделения РНК! Раствор не хранится!

4.6. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе (если используются плашки или стрипованные пробирки – на предназначенной для этого центрифуге; значение угловой скорости (об/мин) в этом случае может отличаться от указанного).

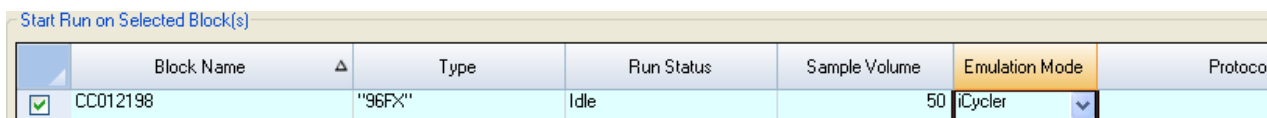
4.7. Открыть крышку системы для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени при помощи кнопки на корпусе или кнопки  на вкладке **Start Run** окна **Experiment Setup**. Перенести пробирки в прибор в точном соответствии заданной схеме расположения образцов. Закрыть крышку нажатием кнопки на корпусе прибора или кнопки  на вкладке **Start Run** окна **Experiment Setup**.


ВНИМАНИЕ! Ни в коем случае не открывать и не закрывать крышку прибора вручную!

4.8. В поле (1) щелкнуть правой клавишей мыши, в появившемся меню активировать пункт **Emulation mode**



4.9. В поле **Sample Volume** указать объем реакционной смеси **50** мкл, в поле Emulation Mode выбрать **iCycler**





4.10. Нажать кнопку  на вкладке **Start Run** окна **Experiment Setup**. Программа попросит задать имя файла, в который будут записываться результаты, после чего приступит к исполнению протокола амплификации.

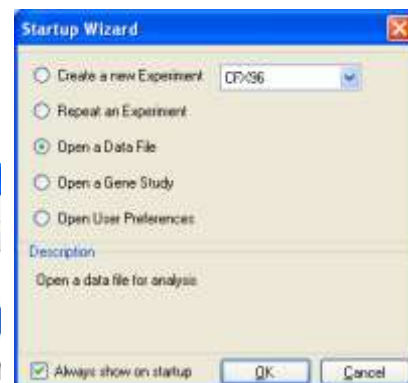
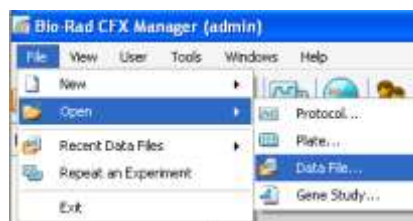
5. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

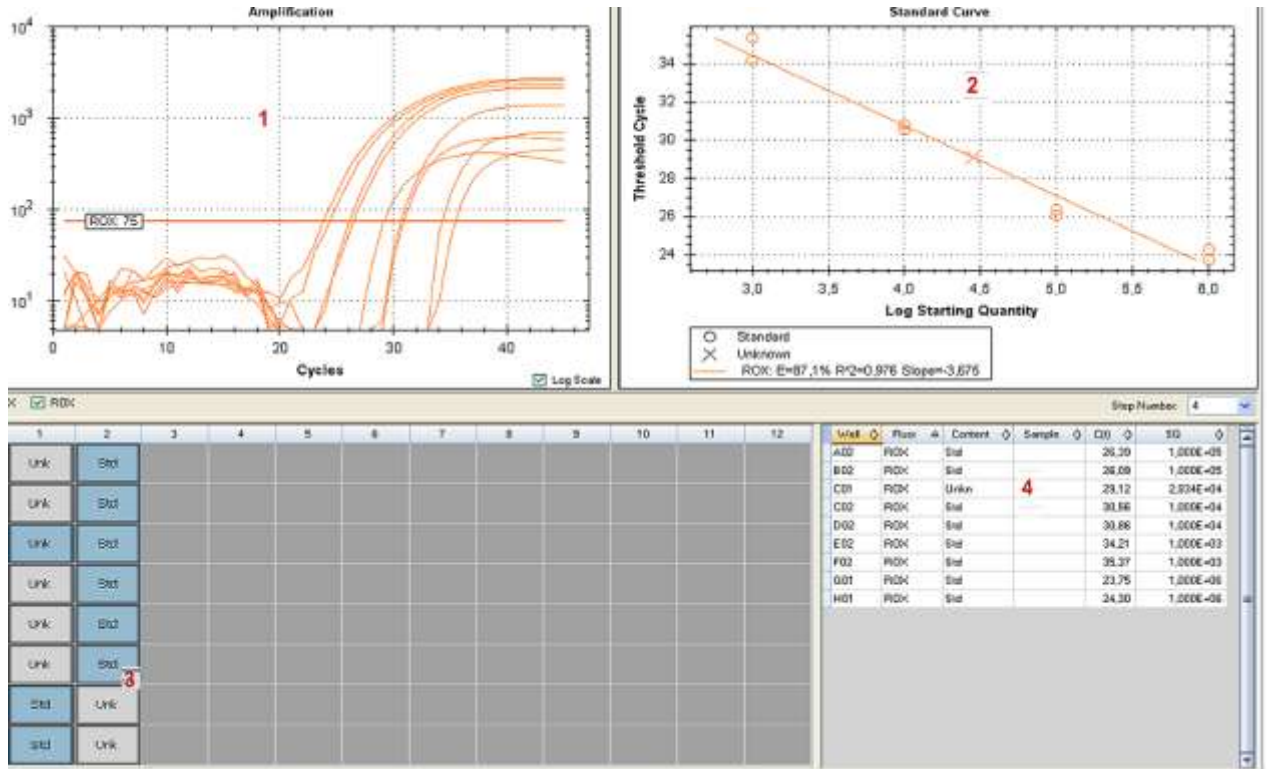
6. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1. По завершении реакции появится окно **Data Analysis** в котором проводится анализ результатов ПЦР. Файл данных также может быть загружен путем выбора пункта «Open a Data File» с последующим нажатием кнопки **Ok** в окне **Startup Wizard**,

выбора пункта **Data File** в подменю **Open** меню **File** в главном окне программы  или нажатием кнопки .



6.2. Структура окна анализа



Анализ результатов проводится во вкладке **Quantitation** окна **Data Analysis**.

- 1 – окно отображения кривых накопления флуоресцентного сигнала;
- 2 – окно построения калибровочной кривой при проведении количественного анализа (в случае отсутствия в постановке стандартных образцов окно остаётся пустым);
- 3 – окно расположения образцов;
- 4 – окно отображения результатов анализа (если в постановке не участвовали стандартные образцы, то столбец **SQ** в таблице будет отсутствовать).

6.3. Отметить флуорофор HEX и снять галочку с флуорофора ROX. Кликнуть правой клавишей мыши в окне 1 и в появившемся меню выбрать пункт **Baseline Threshold...** В рамке **Crossing Threshold** выбрать «User Defined» и задать положение пороговой линии для внутреннего контроля **100**. Нажать **Ok** для принятия внесённых изменений.

6.4. Отметить флуорофор ROX и снять галочку с флуорофора HEX. Задать положение пороговой линии, как было описано в п. 6.4. В рамке **Crossing Threshold** выбрать «User Defined» и задать положение пороговой линии для спецификации **75**. Нажать **Ok** для принятия внесённых изменений.

Baseline Threshold

Baseline Cycles

Auto Calculated

User Defined **Bold** indicates a changed value.

	Well	Fluor	Baseline Begin	Baseline End
1	A01	ROX	3	20
2	A02	ROX	3	20
3	B01	ROX	3	20
4	B02	ROX	3	20
5	C01	ROX	3	20
6	C02	ROX	3	20
7	D01	ROX	3	20
8	D02	ROX	3	20
9	E01	ROX	3	20
10	E02	ROX	3	20
11	F01	ROX	3	20

All Selected Rows: Begin: 2 End: 2

Single Threshold


Auto Calculated: -9,65

User Defined: 75,00

OK Cancel

* - **Внимание!** Приведенные значения подходят к приборам данного типа в большинстве случаев. Однако для отдельных приборов или после перекалибровки шкалы интенсивности может измениться. Для проверки адекватности следует перейти в логарифмический режим отображения данных. В этих условиях правильному положению Threshold соответствует середина линейного участка подъема кривой.

6.5. По завершении этих действий программа автоматически рассчитает точки пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с линией *Threshold (Threshold Cycle, или Ct)*, а если в постановке присутствовали стандартные образцы – построит калибровочную кривую и рассчитает содержание РНК в исследуемых образцах.

6.6. В отчёт могут быть выведены данные как отдельно по каждому из флуорофоров (для этого во вкладке **Quantitation** следует отметить выбранный флуорофор, сняв отметку с другого), так и по обоим флуорофорам сразу (во вкладке **Quantitation** отмечены оба), в этом случае рекомендуется в окне 4 задать сортировку данных по лункам (кликнуть мышкой на заголовок столбца **Well**). Для вывода редактора отчетов нажать кнопку . Подготовленный отчет может быть как сохранён в виде файла, так и распечатан.

6.7. Интерпретация результатов качественного анализ производится согласно таблице:

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct ROX – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор ROX) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

N/A – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

	Ct ROX(FAM)	Ct HEX	Результат
К+ выделения	<45	<40	Выделение и специфическая реакция прошли.
К+ ПЦР	<45	любой	Специфическая реакция прошла.
К- ПЦР	НЗ	НЗ	Специфическая контаминация и контаминация внутренним контролем отсутствует.
	<45	НЗ	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ	<40	Контаминация внутренним контролем. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К- выделения	НЗ	<40	Специфическая контаминация отсутствует.
	НЗ	>40	Ингибирование или недостаточное выделение РНК
	<45	<40	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
Анализируемый образец	<45	<40	ПРИСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	НЗ	<40	ОТСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	<НЗ или НЗ	НЗ или >40	Ингибирование или недостаточное выделение РНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

6.8. Интерпретация результатов количественного анализа:

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

N/A – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

	Содержание РНК	Ct HEX	Результат
Исследуемый образец	≥ чувствит.	до 40	Присутствие РНК возбудителя в указанной концентрации
		после 40	Присутствие РНК возбудителя, конкуренция между системами специфики и внутреннего контроля. Перестановка не требуется
	< чувствит.	до 40	Сомнительный результат, возможна контаминация. Требуется повтор анализа данного образца.
	N/A	до 40	Отсутствие РНК возбудителя
после 40		Ингибирование. Требуется перевыделение и повтор анализа данного образца.	
Отрицательный контрольный образец ПЦР	N/A	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР отсутствует
	до 45	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР. Требуется принятие антиконтаминационных мер и повтор анализа.
Отрицательный контрольный образец выделения	N/A	до 40	Специфическая контаминация отсутствует
	до 45	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР или выделения. Требуется принятие антиконтаминационных мер и повтор анализа, начиная с этапа выделения.

Внимание! Надежными можно считать численные значения только для тех образцов, значения Ct для которых лежат между максимальным и минимальным значениями Ct для стандартных образцов!

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТА В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «ДТ-96» (ДНК-технология)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

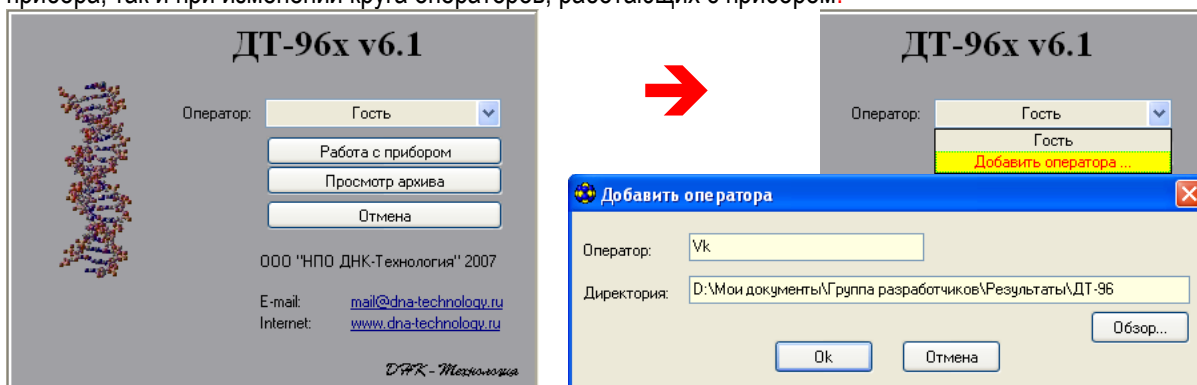
Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени амплификатора детектирующего ДТ-96 (ДНК-Технология) представляет собой программируемый термостат (амплификатор), сопряженный с оптической системой детекции флуоресцентного сигнала по 5 каналам, соответствующим флуорофорам FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5,5 через крышки пробирок. Система позволяет проводить ПЦР и регистрировать сигнал от образцов по заданным каналам в каждом цикле. По окончании реакции управляющая программа строит кривые накопления фонового сигнала от каждого образца в каждом из задействованных каналов, по которым в дальнейшем и производится анализ результатов. Для работы с наборами БИОТИТР-С используются каналы ROX (специфический сигнал) и HEX (сигнал внутреннего контроля).

В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с наборами БИОТИТР-С. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции по использованию прибора или к его изготовителям.

2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

Перед первым использованием прибора с наборами БИОТИТР-С необходимо выполнить следующие действия.

2.1. Определение списка операторов. Этот шаг выполняется как перед первым использованием прибора, так и при изменении круга операторов, работающих с прибором.

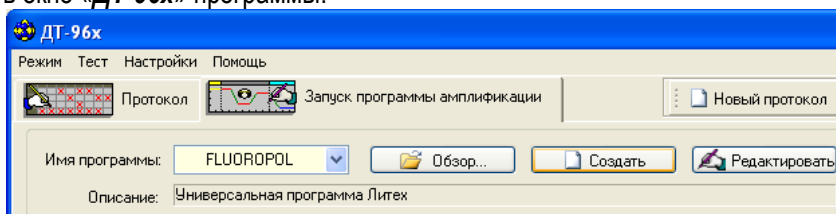


Для изменения списка операторов надо в стартовом окне программы нажать строку «**Оператор:**» и в выпадающем меню выбрать пункт «**Добавить оператора...**». В строке «**Оператор:**» появившегося окна необходимо задать имя оператора, а в строке «**Директория:**» задать ему рабочую папку. Добавление оператора подтвердить нажатием кнопки **ОК**.

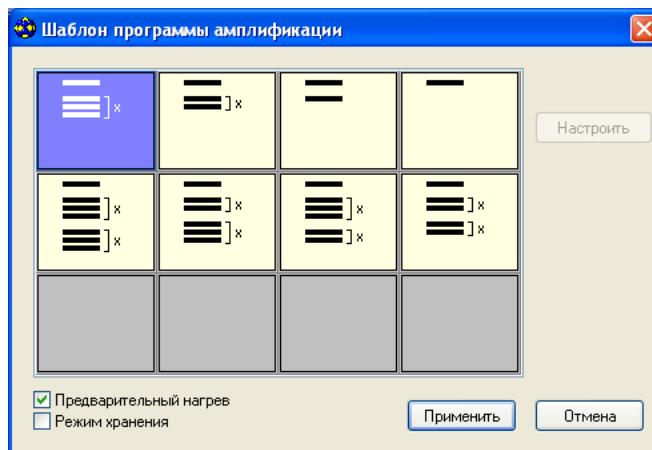
2.2. Создание программы амплификации.

2.2.1. В стартовом окне программы нажать кнопку «**Работа с прибором**», в окне выбора прибора выбрать прибор, если он включен, и перейти в окно «**ДТ-96x**» программы.

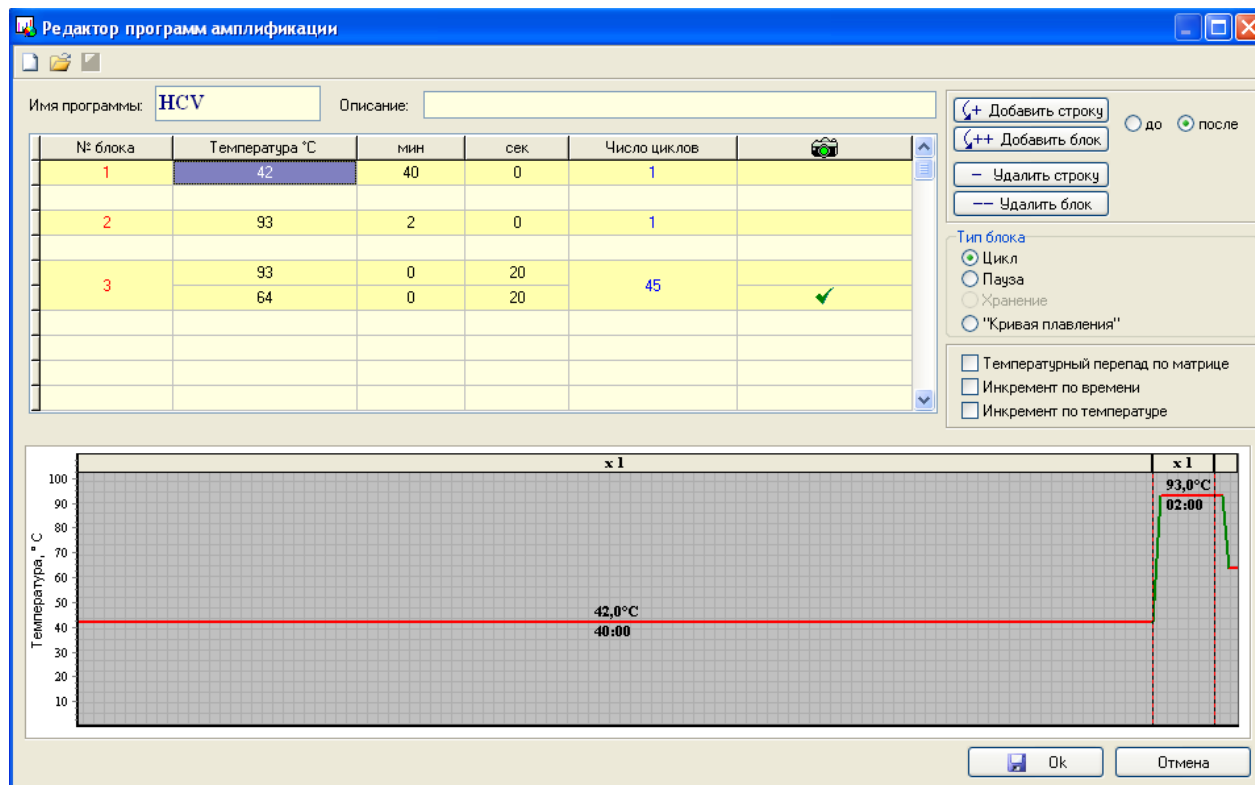
В появившемся окне «**ДТ-96x**» выбрать вкладку «**Запуск программы амплификации**» и в ней нажать кнопку **Создать**.



2.2.2. В окне шаблонов установить флажок «Предварительный нагрев» и выбрать правый верхний шаблон. Нажать кнопку **Применить**.



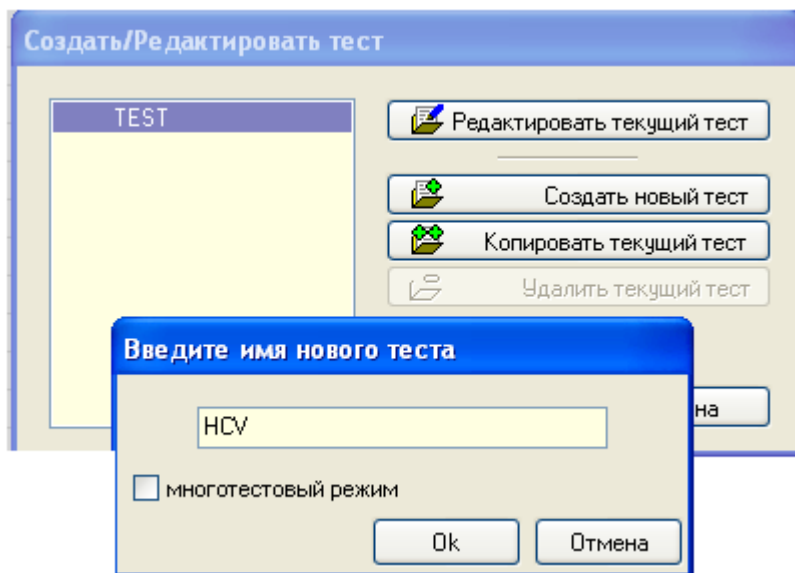
2.2.3. В окне редактора задать программу, приведенную на рисунке ниже (название и описание могут быть любыми). Нажать кнопку **Ok** и сохранить файл.



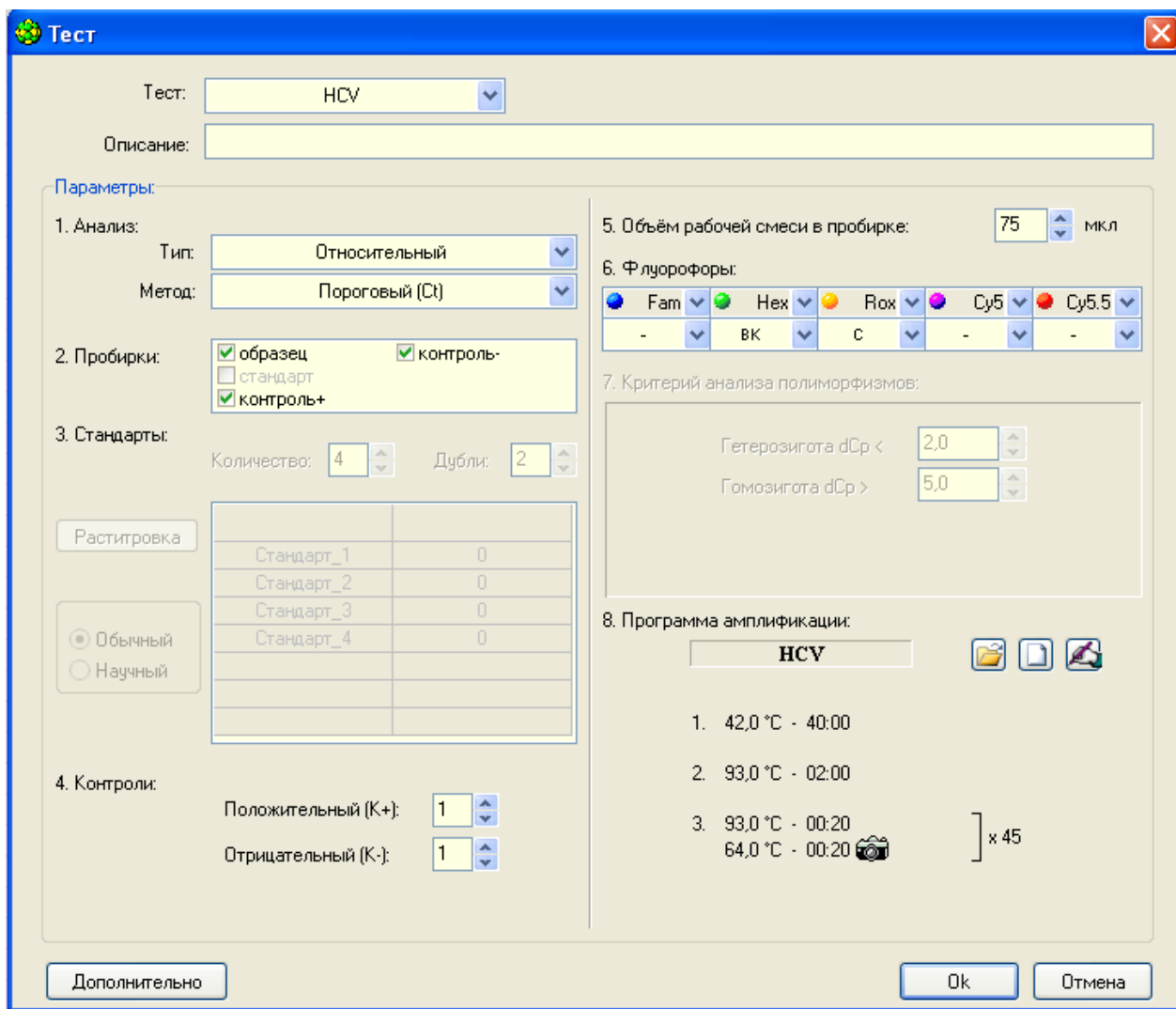
Создание «Тестов» (предустановок для анализа при помощи конкретных диагностических наборов реагентов) позволяет в дальнейшем упростить работу и уменьшить затраты времени при введении протокола и анализе результатов.

2.3.1. В верхней панели меню главного окна программы следует открыть меню «Тест» и в нем выбрать пункт «Создать новый тест» (из этого же меню осуществляется редактирование имеющихся тестов).

2.3.2. Задать в появившемся окне имя теста и нажать **ОК**. Программа выведет окно создания/редактирования теста:



2.3.3. При качественном анализе задать в окне следующие параметры:

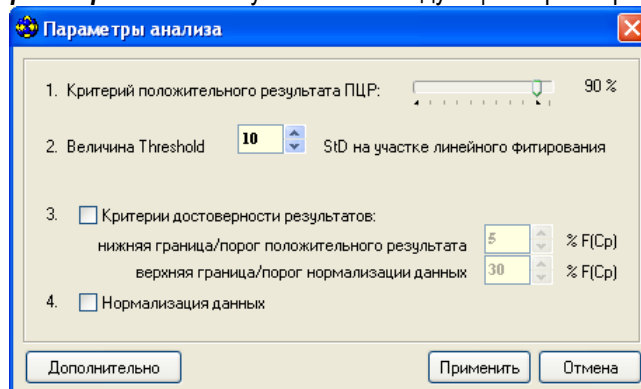


1. Анализ:	Тип:	Относительный Пороговый (Ct)
	Метод:	
2. Пробирки:	<input checked="" type="checkbox"/> образец	
	<input type="checkbox"/> Стандарт	
	<input checked="" type="checkbox"/> контроль+	
	<input checked="" type="checkbox"/> контроль-	
4. Контроли:	Положительный (К+):	1
	Отрицательный (К-):	1
5. Объем рабочей смеси в пробирке:		75 мкл
6. Флуорофоры:	• Rox:	специфика
	• Hex:	ВК
	• Fam:	отсутствует
	• Cy5:	отсутствует
7. Программа амплификации		созданная в п. 2.2

Примечание: можно использовать тип анализа «Качественный», однако «Относительный» более информативен.

2.3.4. Нажать кнопку **Дополнительно** и в окне «**Параметры анализа**» установить следующие параметры:

1. Критерий положительного результата ПЦР: 90%
2. Величина Threshold 10
3. Критерии достоверности результатов:
4. Нормализация данных



2.3.5. Нажать **Применить** в окне «**Параметры анализа**» и **Ок** в окне «**Тест**». Введенный тест будет добавлен в настройки прибора.

2.3.6. При количественном анализе задать в окне следующие параметры:

Тест: HCV

Описание:

Параметры:

1. Анализ: Тип: Количественный со стандартами
Метод: Пороговый (Ct)

2. Пробирки: образец контроль-
 стандарт контроль+

3. Стандарты: Количество: 4 Дубли: 2

Растрировка

	копий
Стандарт_1	1000000
Стандарт_2	100000
Стандарт_3	10000
Стандарт_4	1000

Формат: Обычный Научный

4. Контроли: Положительный (K+): 1
Отрицательный (K-): 1

5. Объем рабочей смеси в пробирке: 75 мкл

6. Флуорофоры: Fam: - Нех: BK Rox: C Cy5: - Cy5.5: -

7. Критерий анализа полиморфизмов: Гетерозигота dCp < 2,0
Гомозигота dCp > 5,0

8. Программа амплификации: HCV

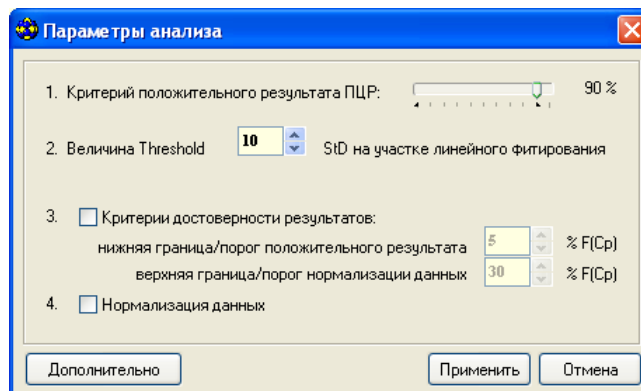
1. 42,0 °C - 40:00
2. 93,0 °C - 02:00
3. 93,0 °C - 00:20
64,0 °C - 00:20 } x 45

Дополнительно Ok Отмена

1. Анализ:	Тип:	Количественный со стандартами
	Метод:	Пороговый (Ct)
2. Пробирки:	<input checked="" type="checkbox"/> образец	
	<input checked="" type="checkbox"/> Стандарт	
	<input type="checkbox"/> контроль+	
	<input checked="" type="checkbox"/> контроль-	
3. Стандарты:	Количество:	4
	Дубли:	1
	Стандарт_1	1000000 копий
	Стандарт_2	100000 копий
	Стандарт_3	10000 копий
	Стандарт_4	1000 копий
4. Контроли:	Положительный (K+):	
	Отрицательный (K-):	1
5. Объем рабочей смеси в пробирке:		75 мкл
6. Флуорофоры:	• Rox:	специфика
	• Нех:	BK
	• Fam:	отсутствует
	• Cy5:	отсутствует
7. Программа амплификации		созданная в п. 2.2

2.3.7. Нажать кнопку **Дополнительно** и в окне «**Параметры анализа**» установить следующие параметры:

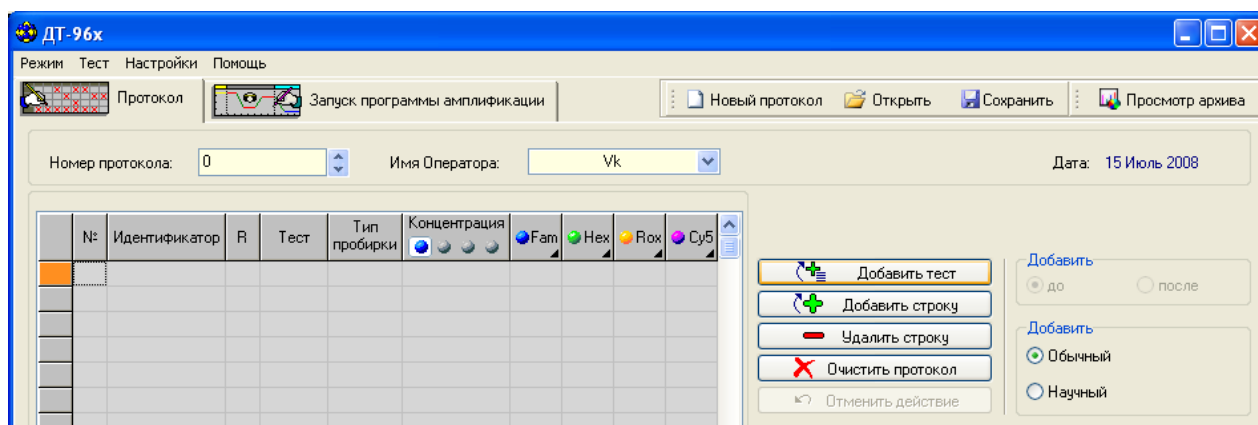
1. Критерий положительного результата ПЦР: 90%
2. Величина Threshold 10
3. Критерии достоверности результатов:
4. Нормализация данных



2.3.8. Нажать **Применить** в окне «*Параметры анализа*» и **Ок** в окне «*Тест*». Введенный тест будет добавлен в настройки прибора.

3. СОЗДАНИЕ РАБОЧЕГО ПРОТОКОЛА

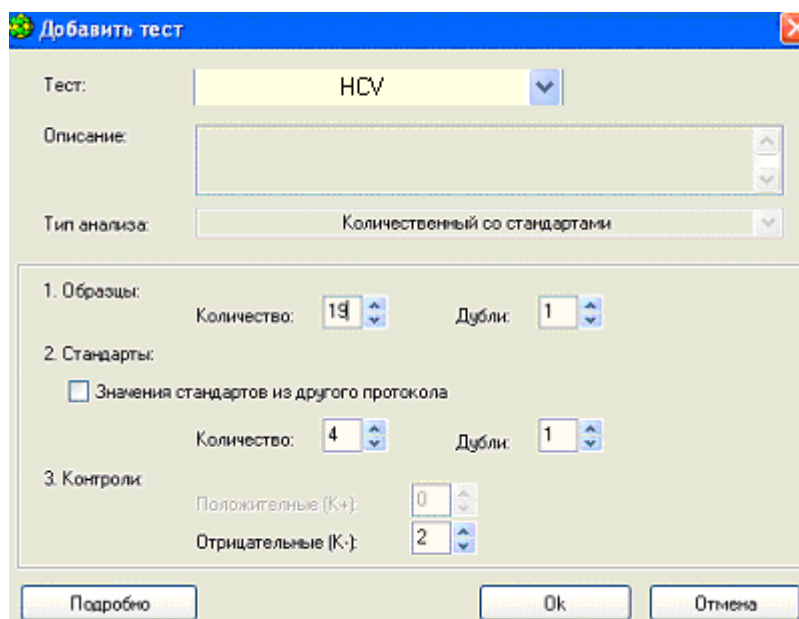
Создание и редактирование протоколов производится во вкладке «*Протокол*» окна «*ДТ-96х*».



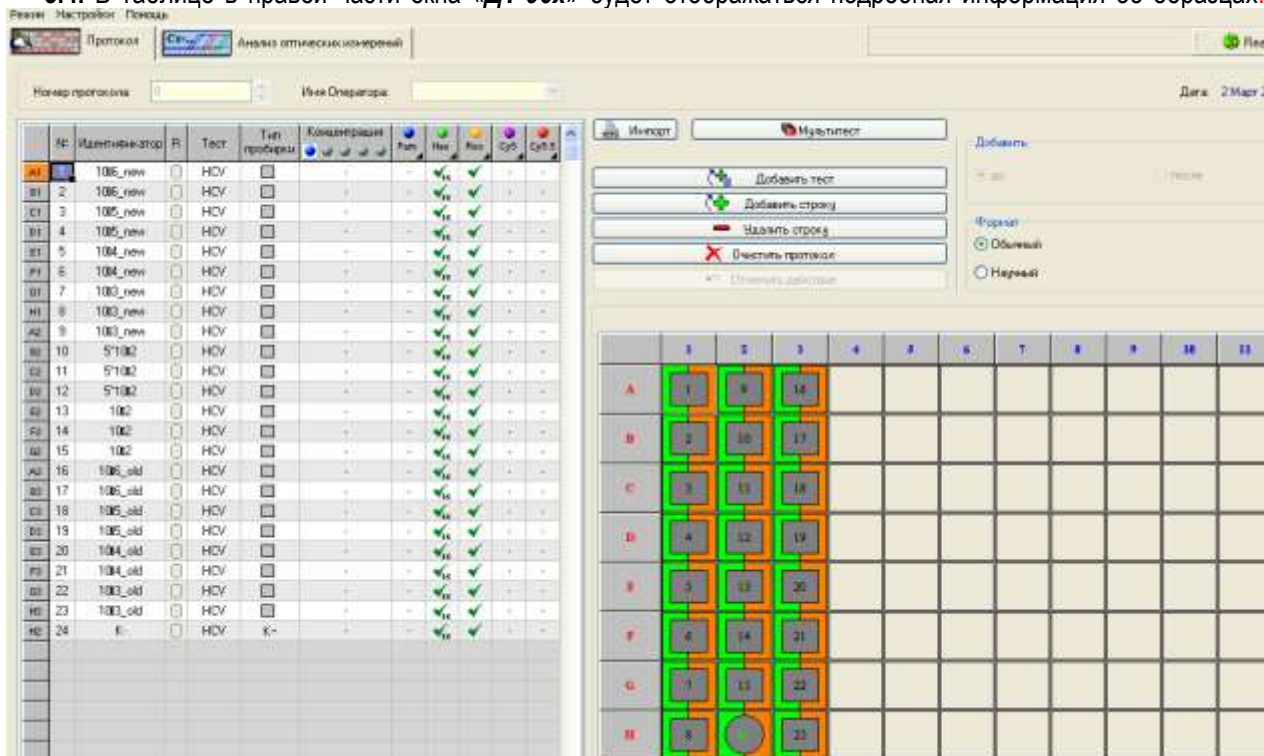
3.1. Если требуемый или близкий к нему протокол был создан ранее, его можно загрузить, нажав кнопку **Открыть** и, при необходимости, отредактировать.

3.2. Для создания нового протокола следует нажать кнопку **Новый протокол**, задать «*Номер протокола*» (опционально) и выбрать из списка «*Имя Оператора*» (протокол и результаты будут по умолчанию сохранены в назначенную данному оператору рабочую папку).

3.3. Для добавления в протокол данных следует нажать кнопку **Добавить тест**, в окне «*Добавить тест*» выбрать из списка «*Тест:*» требуемый, и задать количество образцов. Если не предполагается ставить в дублях все образцы или большую их часть, то значение поля «*Дубли:*» следует оставить равным 1, при этом суммарное число образцов следует указывать без учета дублей. После нажатия кнопки **Ок** данные будут добавлены в протокол в главном окне, где при необходимости они могут быть отредактированы.



3.4. В таблице в правой части окна «ДТ-96х» будет отображаться подробная информация об образцах.



Для добавления образца следует сделать активной строку с описанием образца, перед которым будет производиться добавление и нажать кнопку **Добавить строку**.

Для удаления образца следует сделать удаляемую строку активной и нажать кнопку **Удалить строку**.

В столбце «Идентификатор» можно задать реальные названия образцов.

Кликнув напротив образца в столбце «R» можно назначить ему дубль, который автоматически добавится в список и будет автоматически иметь то же описание, что и основной образец.

В столбце «Тип пробирки» можно изменить тип образца, выбрав нужный из открывающегося списка.

3.5. В правой части окна снизу расположена матрица расположения образцов в блоке. При «автозаполнении» программа сама расставляет образцы в порядке по умолчанию. При «Свободном заполнении» пользователь задает расположение образцов самостоятельно. При необходимости порядок расположения образцов может быть изменен (горизонтальный или вертикальный).

3.6. Для добавления пробирок из других тестов следует повторить пункты, начиная с 3.2.

3.7. Созданный протокол может быть сохранен для дальнейшей работы при помощи кнопки **Сохранить**.

3.8. Завершив работу с протоколом необходимо нажать кнопку **Применить**. После этого введенные данные будут приняты программой и использованы в дальнейшей работе.

Примечание: после завершения создания протокола рекомендуется не проводить никаких операций в окне «ДТ-96х» до запуска реакции амплификации.

4. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке **бесцветные** пробирки с оптическими крышками, соответствующие рекомендациям производителя прибора, вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. **Маркировка пробирок не допускается!**

4.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирки с Taq-полимеразой, обратной транскриптазой и ингибитором рибонуклеаз в ледяную баню). Пробирки с полностью размороженным содержимым тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

Внимание! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

4.3. Приготовить рабочую смесь из расчета на 1 пробу

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	43
Реакционная смесь	12
Дитиотрейтол (ДТТ)	0,15
Ингибитор рибонуклеаз	0,5
Обратная транскриптаза	0,2
Тақ-полимераза	0,8

Тщательно перемешать смесь пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или импульсным вортексированием 15-20 раз.

4.4. Внести в приготовленные пробирки по 55 мкл полученной рабочей смеси.

4.5. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 20 мкл:

- в пробирку отрицательного контроля ПЦР – разбавитель;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы РНК;
- в пробирку положительного контрольного образца - положительный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки стандартных контрольных образцов (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶) для количественного определения – соответствующие образцы, прошедшие процедуру выделения;

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

Внимание!! ПЦР анализ должен быть проведен в течение 20-30 минут после выделения РНК! Раствор не хранится!

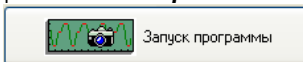
4.6. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18...+25°C) на микроцентрифуге-вортексе (если используются плашки или стрипованные пробирки – на предназначенной для этого центрифуге; значение угловой скорости (об/мин) в этом случае может отличаться от указанного).

4.7. Не менее чем за 10 минут до постановки включить детектирующий амплификатор для прогрева.

4.8. Перенести пробирки в детектирующий амплификатор в точном соответствии с заданным ранее протоколом расположения образцов и задвинуть термоблок.

4.9. Для запуска реакции управляющая программа должна находиться в режиме «Работа с прибором» (активным является окно «ДТ-96х»). Перед проведением амплификации необходимо убедиться, что во вкладке «**Протокол**» задан требуемый протокол, во вкладке «**Запуск программы амплификации**» задана описанная в п.п. 2.2. программа амплификации и «**Объем рабочей смеси**» указан равным 50 мкл. Чтобы

начать реакцию следует нажать кнопку



во вкладке «**Запуск программы амплификации**».

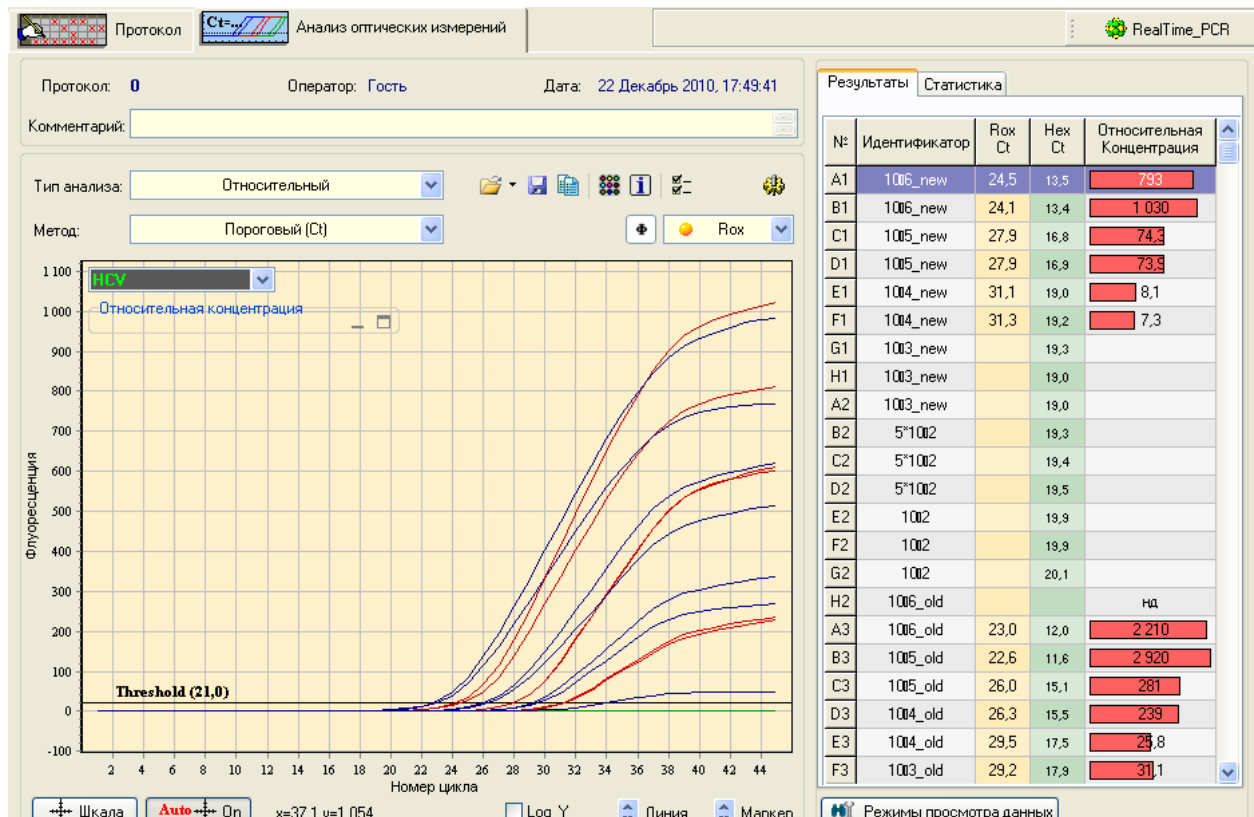
5. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

По завершении амплификации следует сохранить результаты измерений в отдельном файле папки оператора, написав имя файла, и только после этого приступить к анализу. Данные можно анализировать позже в окне «**Архив**» управляющей программы. Это окно может быть вызвано как из стартового окна программы, так и из окна «ДТ-96х» нажатием на кнопку **Просмотр архива**. Анализ данных можно вести при работающем приборе.

6. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По окончании амплификации открывается основное окно, где можно вести анализ данных по использованным каналам (для наборов БИОТИТР-С - ROX и HEX).



6.1. Перед анализом результатов следует убедиться, что все параметры соответствуют рекомендуемым.

а) Во вкладке «Анализ оптических измерений»:

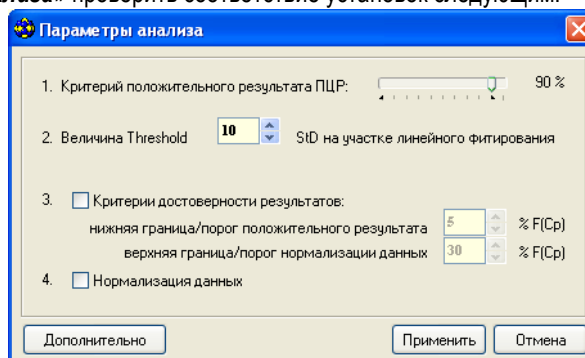
	Качественный	Количественный
Тип анализа:	Относительный	Количественный со стандартами
Метод:	Пороговый (Ct)	Пороговый (Ct)



Кнопка режима фитирования (расположена возле окна выбора флуорофора) должна быть в активном режиме. На графике с кривыми накопления фонового сигнала должна иметься горизонтальная линия **Threshold** с числовым значением над ней (если она отсутствует, необходимо повторно задать **Метод**).

б) Нажать кнопку **Параметры** и в окне «**Параметры анализа**» проверить соответствие установок следующим:

1. Критерий положительного результата ПЦР: 90%
2. Величина Threshold 10
3. Критерии достоверности результатов:
4. Нормализация данных



6.3. Пороговая линия **Threshold** выставляется для каждого канала отдельно. Для максимально точного выставления следует поставить флажок **Log_Y** и передвинуть линию таким образом, чтобы ее числовое значение оказалось наиболее близким к заданному в таблице.

Данная линия должна лежать примерно на уровне середины линейного отрезка подъемов кривых в логарифмических координатах.

	Флуорофор	Threshold*	Конечный цикл (КЦ)
Внутренний контроль	● Hex	100	30
Специфика	● Rox	20	45

* - **Внимание!** Приведенные значения подходят к приборам данного типа в большинстве случаев. Однако для отдельных приборов или после перекалибровки шкала интенсивности может измениться. Для проверки адекватности следует перейти в логарифмический режим отображения данных. В этих условиях правильному положению Threshold соответствует середина линейного участка подъема кривой.

6.4. В таблице справа для каждого образца будут выведены измеренные значения циклов пересечения кривых накопления специфического («Rox Ct») сигнала и сигнала внутреннего контроля («Hex Ct») с соответствующими пороговыми линиями. Эти цифры используются для дальнейшей интерпретации результатов.

При количественном анализе со стандартами в таблице будет присутствовать столбец «Абсолютная концентрация», в который будут выводиться измеренные концентрации образцов.

Результаты				
Статистика				
Дополнительные стандарты				
№	Идентификатор	Rox Ct	Hex Ct	Абсолютная Концентрация
A1	1006_new	24,5	13,5	153 000
B1	1006_new	24,1	13,4	219 000
C1	1005_new	27,9	16,8	5 190
D1	1005_new	27,9	16,9	5 150
E1	1004_new	31,1	19,0	212
F1	1004_new	31,2	19,2	183
G1	1003_new		19,3	
H1	1003_new		19,0	
A2	1003_new		19,0	
B2	5*1002		19,3	
C2	5*1002		19,4	
D2	5*1002		19,5	
E2	1002		19,9	
F2	1002		19,9	
G2	1002		20,1	
A3	1006_old	23,0	12,0	1,0E+06
B3	1005_old	22,6	11,6	100 000
C3	1005_old	25,9	15,1	100 000
D3	1004_old	26,2	15,5	10 000
E3	1004_old	29,4	17,5	10 000
F3	1003_old	29,1	17,9	1 000
G3	1003_old		19,1	
H3	K-	34,0	18,6	11,3

6.5. Интерпретация результатов качественного анализа производится согласно таблице:

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct ROX – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор ROX) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

N/A – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

	Ct ROX(FAM)	Ct HEX	Результат
К+ выделения	<45	<40	Выделение и специфическая реакция прошли.
К+ ПЦР	<45	любой	Специфическая реакция прошла.
К- ПЦР	НЗ	НЗ	Специфическая контаминация и контаминация внутренним контролем отсутствует.
	<45	НЗ	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ	<40	Контаминация внутренним контролем. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К- выделения	НЗ	<40	Специфическая контаминация отсутствует.
	НЗ	>40	Ингибирование или недостаточное выделение РНК
	<45	<40	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
Анализируемый образец	<45	<40	ПРИСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	НЗ	<40	ОТСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	<НЗ или НЗ	НЗ или >40	Ингибирование или недостаточное выделение РНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

6.6. Интерпретация результатов количественного анализа производится согласно таблице:

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

N/A – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

	Содержание РНК	Ct HEX	Результат
Исследуемый образец	≥ чувствит.	до 40	Присутствие РНК возбудителя в указанной концентрации
		после 40	Присутствие РНК возбудителя, конкуренция между системами специфики и внутреннего контроля. Перестановка не требуется
	N/A	до 40	Сомнительный результат, возможна контаминация. Требуется повтор анализа данного образца.
		после 40	Отсутствие РНК возбудителя Ингибирование. Требуется перевыделение и повтор анализа данного образца.
Отрицательный контрольный образец ПЦР	N/A	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР отсутствует
	до 45	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР. Требуется принятие антиконтаминационных мер и повтор анализа.
Отрицательный контрольный образец выделения	N/A	до 40	Специфическая контаминация отсутствует
	до 45	до 40	Специфическая контаминация на стадии ПЦР или выделения. Требуется принятие антиконтаминационных мер и повтор анализа, начиная с этапа выделения.

Внимание! Надежными можно считать численные значения только для тех образцов, значения Ct для которых лежат между максимальным и минимальным значениями Ct для стандартных образцов!

6.7. Сохранить файл с результатами.

6.8. При нажатии кнопки **Отчёт** окна «Анализ оптических измерений» появляется окно «Создание отчёта», в котором можно сформировать, просмотреть, сохранить в виде файла и распечатать проанализированные данные в виде отчета.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТА В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «ROTOR-GENE Q» (CORBETT RESEARCH)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «Rotor-Gene» представляет собой программируемый термостат (амплификатор), сопряженный с оптической системой детекции флуоресцентного сигнала по 6 каналам через дно пробирки. Одна загрузка прибора (в зависимости от типа установленного ротора) может составлять 36 пробирок по 200 мкл или 72 пробирки по 100 мкл. Система позволяет проводить ПЦР и регистрировать сигнал от образцов по заданным каналам в каждом цикле. Управляющая программа строит кривые накопления сигнала от каждого образца в каждом из задействованных каналов, по которым в дальнейшем и производится анализ результатов. Для работы с наборами БИОТИТР-С используются каналы Green (специфический сигнал) и Yellow (сигнал внутреннего контроля).

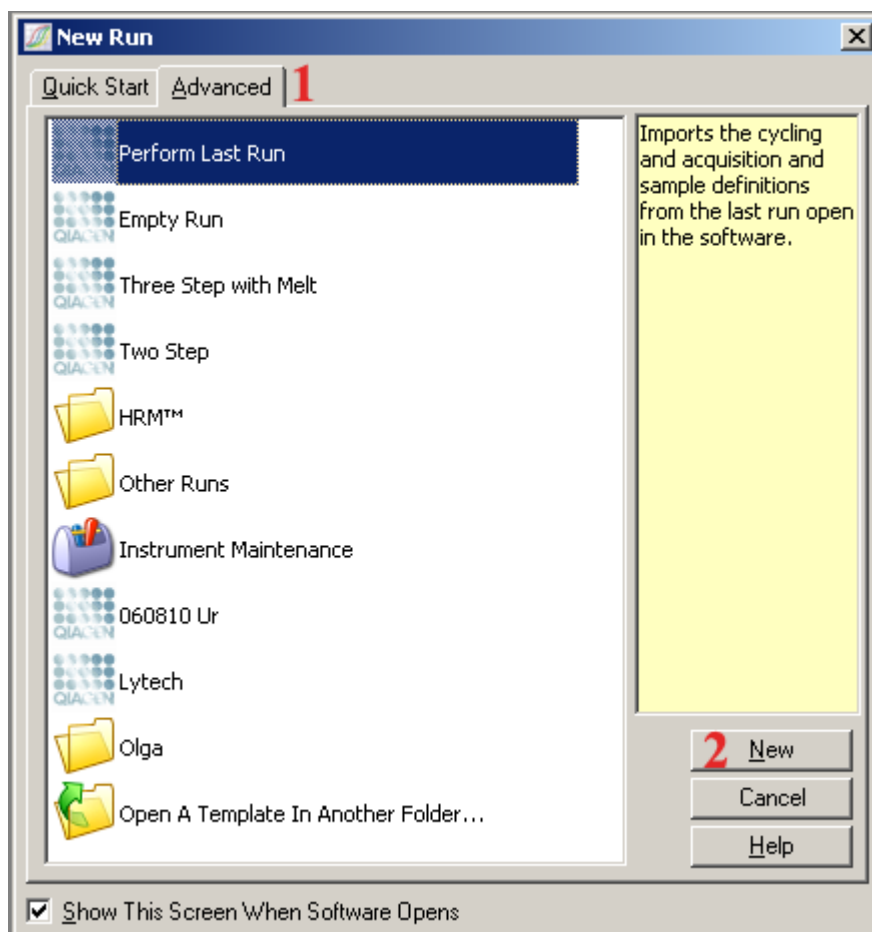
В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с наборами БИОТИТР-С. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции по использованию прибора или к его изготовителям.

2. ПЕРЕД ПЕРВЫМ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

Создание протокола амплификации

2.1. Запустить управляющую программу. После запуска программа выведет окно выбора протоколов

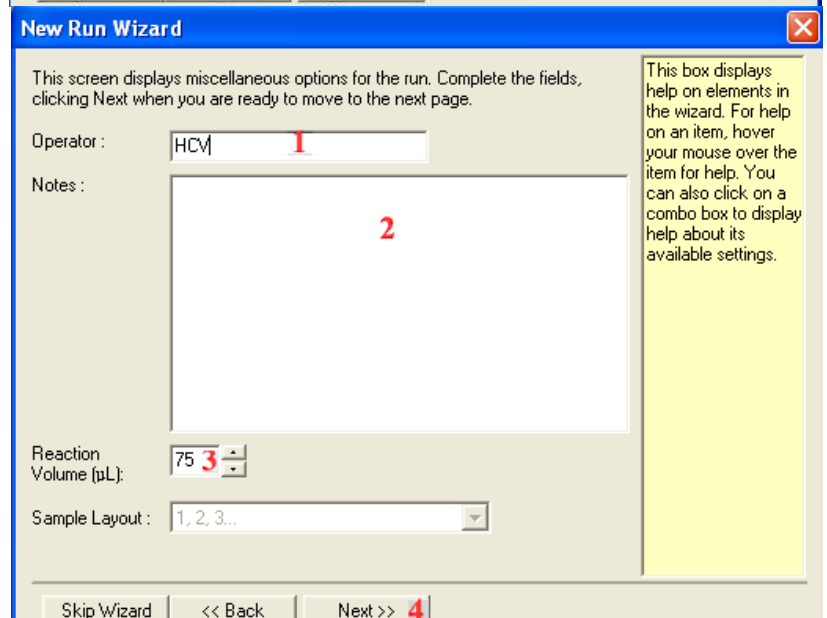
2.2. На вкладке **Advanced** (1) нажать кнопку **New** (2). Программа перейдет к мастеру создания протокола.



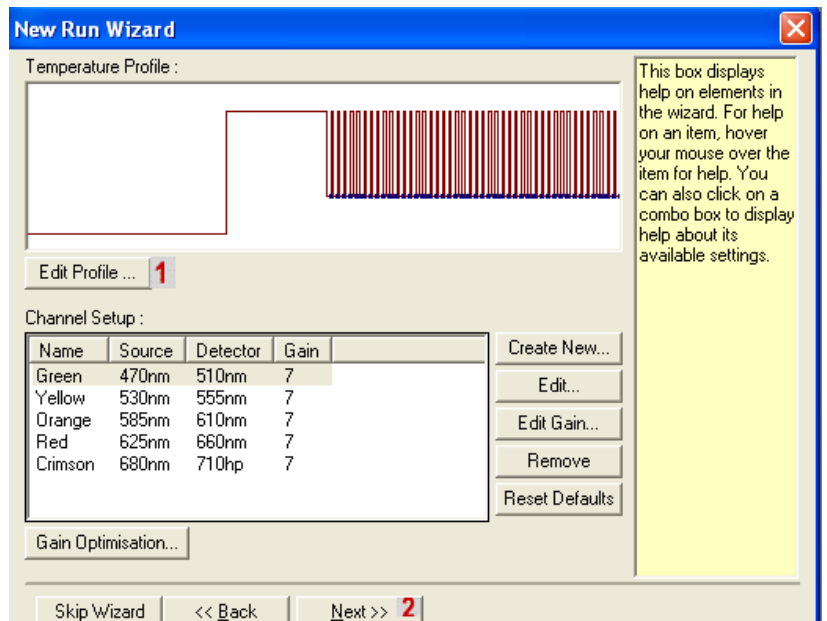
2.3. В поле (1) выбрать использующийся тип ротора. Отметить флажком **Locking Ring Attached** (прижимное кольцо надето на барабан). Нажать кнопку **Next>** (2)



2.4. В появившемся окне в поле (1) задается оператор, в поле (2) при необходимости можно ввести комментарий к протоколу. В поле **Reaction Volume** (3) следует задать объем реакционной смеси – 75 мкл. Нажать кнопку **Next>>** (4)



2.5. Для введения температурного профиля амплификации нажать кнопку **Edit Profile...** (1). Программа амплификации для набора БИОТИТР-С на данном приборе следующая:



1	+50°C	30 минут	
2	+95°C	15 минут	
3	+95°C	20 секунд	45 циклов
	+64°C	40 секунд*	

* измерение флуоресценции по каналам **Orange/ Yellow**

➤ В поле (5) окна **Edit Profile** кнопками (6) задать стадии **Hold**, **Hold 2** и **Cycling** согласно таблице и рисунку.

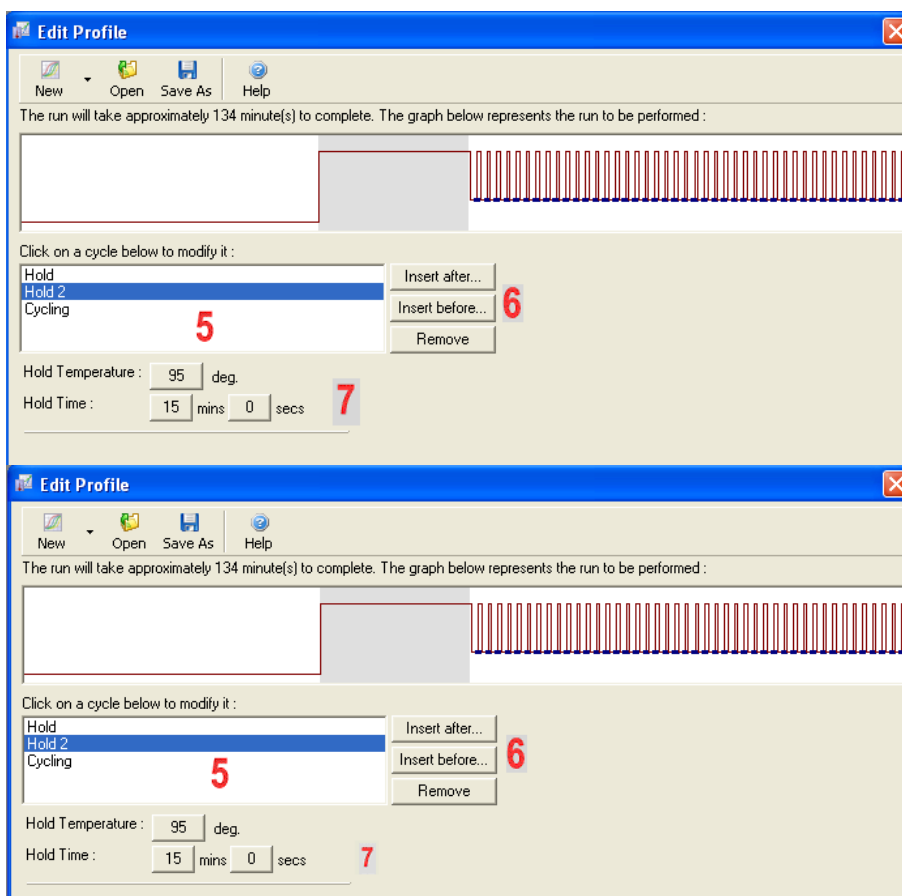
➤ Выбрать в поле (5) стадию **Hold**.

➤ Указать параметры шага (7) согласно таблице.

➤ Выбрать в поле (5) стадию **Hold 2**.

➤ Указать параметры шага (7) согласно таблице.

➤

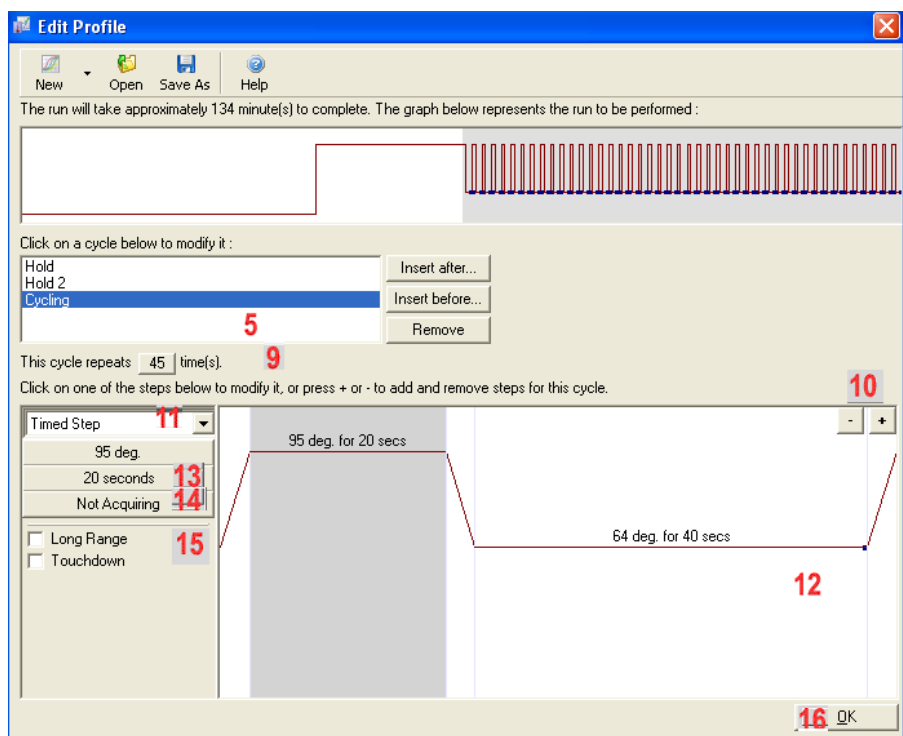


➤ Выбрать в поле (5) стадию **Cycling**.

➤ Задать число циклов (9) равным 45 (см. таблицу и рисунок).

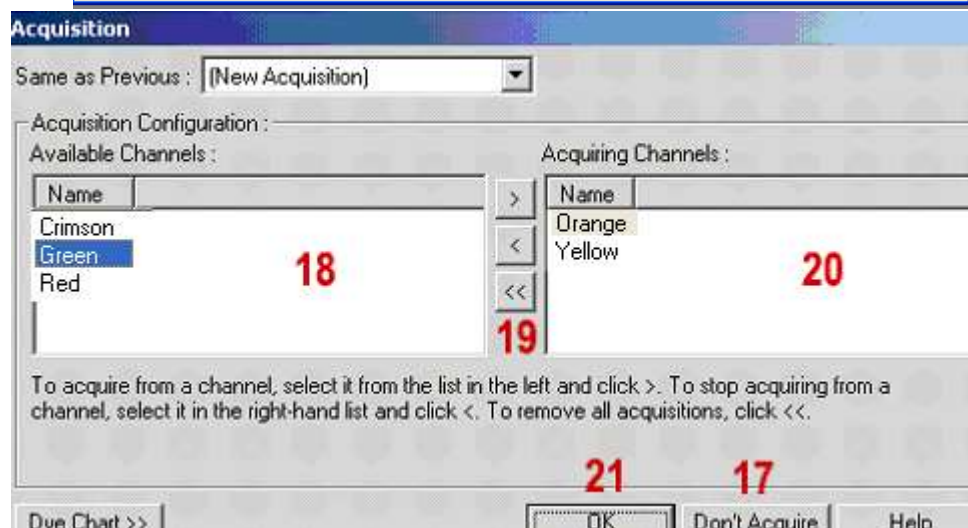
➤ Кнопками (10) задать нужное число шагов внутри цикла (см. таблицу и поле (12) рисунка).

➤ Для каждого шага выбрать из списка (11) **Timed Step**, задать параметры шага (13) согласно таблице. Флажки для параметров **Long Range** и **Touchdown** (15) должны отсутствовать.



➤ Для всех шагов в цикле, кроме среднего, нажать кнопку (14). В появившемся окне Acquisition выбрать функцию **Don't Acure** (17).

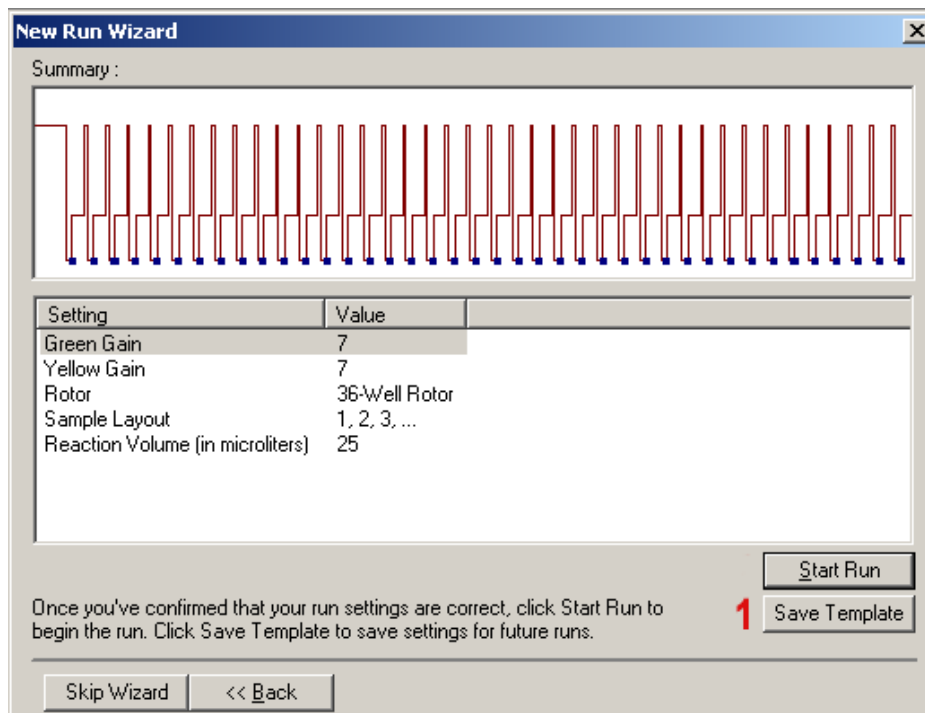
➤ Для последнего шага в цикле нажать кнопку (14). Поместить в список **Acquiring Channels:** (20) каналы Green и Yellow.



Доступные незадействованные каналы выбираются из списка **Available Channels:** (18) и перемещаются в список (20) кнопками (19). По завершении выбора нажать кнопку **Ok** (21).

После завершения создания протокола нажать кнопку **Ok** (16).

2.6. В последнем окне мастера создания протокола можно проверить параметры протокола амплификации. Нажав на кнопку (1) сохраните шаблон и закройте окно.



3. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке бесцветные пробирки с оптическими крышками, соответствующие рекомендациям производителя прибора, вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается!

3.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирки с Taq-полимеразой, обратной транскриптазой и ингибитором рибонуклеаз в ледяную баню). Пробирки с полностью размороженным содержимым тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

Внимание! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

3.3. Приготовить рабочую смесь из расчета на 1 пробу

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	43
Реакционная смесь	12
Дитиотрейтол (ДТТ)	0,15
Ингибитор рибонуклеаз	0,5
Обратная транскриптаза	0,2
Taq-полимераза	0,8

Тщательно перемешать смесь пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или импульсным вортексированием 15-20 раз.

3.4. Внести в приготовленные пробирки по 55 мкл полученной рабочей смеси.

3.5. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 20 мкл:

- в пробирку отрицательного контроля ПЦР – разбавитель;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы РНК;
- в пробирку положительного контрольного образца - положительный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;

- в пробирки стандартных контрольных образцов (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) для количественного определения – соответствующие образцы, прошедшие процедуру выделения;

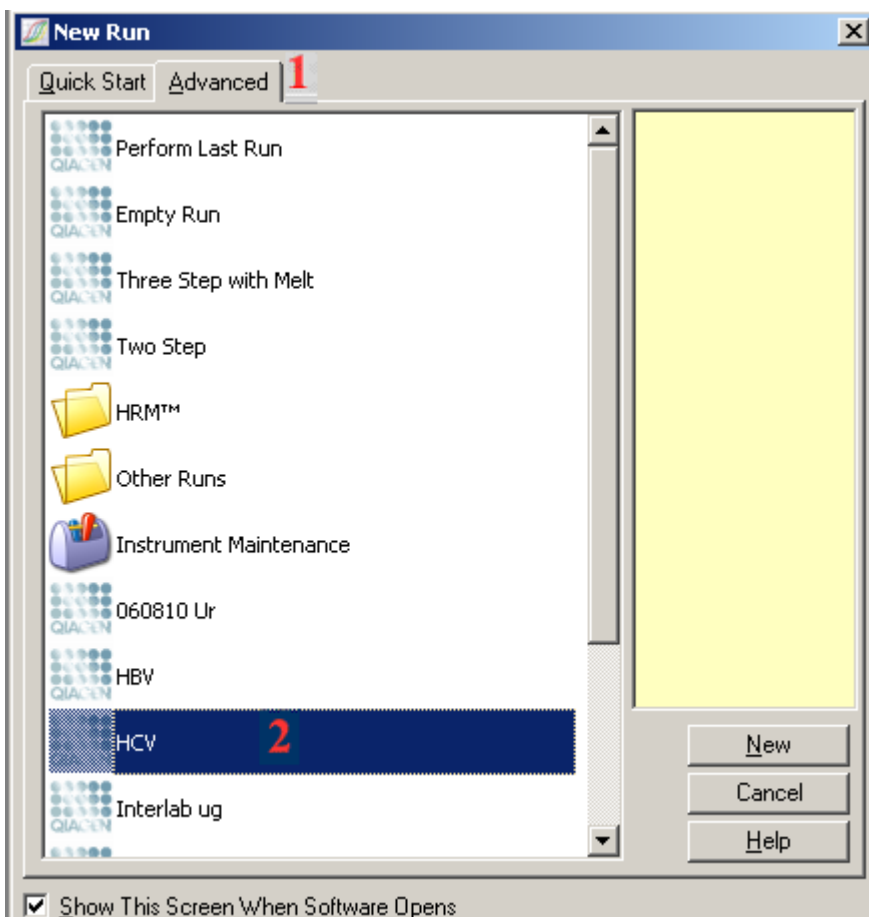
Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

Внимание!! ПЦР анализ должен быть проведен в течение 20-30 минут после выделения РНК! Раствор не хранится!

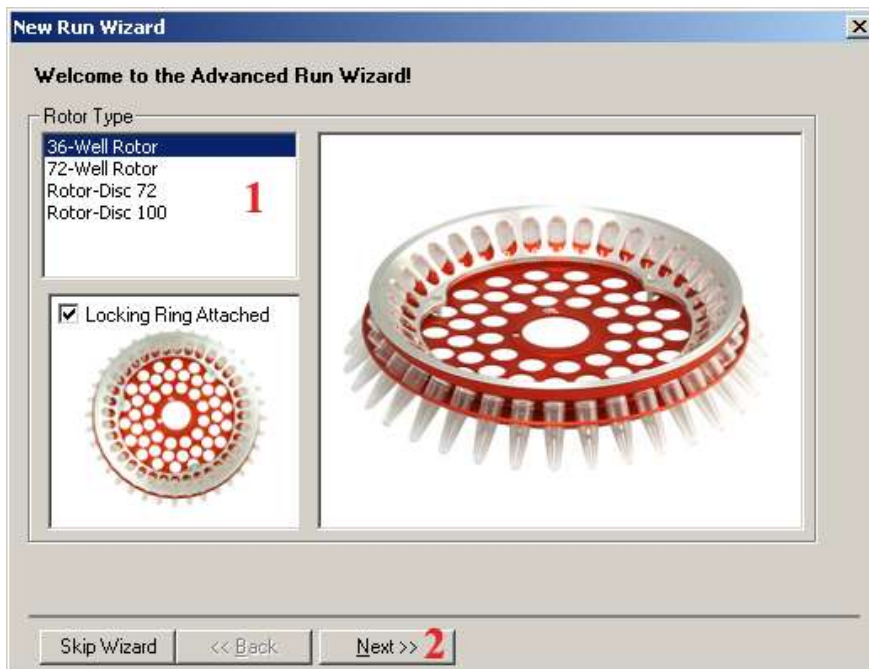
3.6. Пробирки закрыть и установить в прибор, уравновесив ротор (если уравновешивание одними лишь амплификационными пробирками невозможно, следует использовать аналогичные пробирки с водой). Прижать крышки пробирок прижимным кольцом (!)

3.7. Открыть окно **New Run** (автоматически запускается при старте программы, либо вызывается из основной панели инструментов главного окна программы **File>New...**)

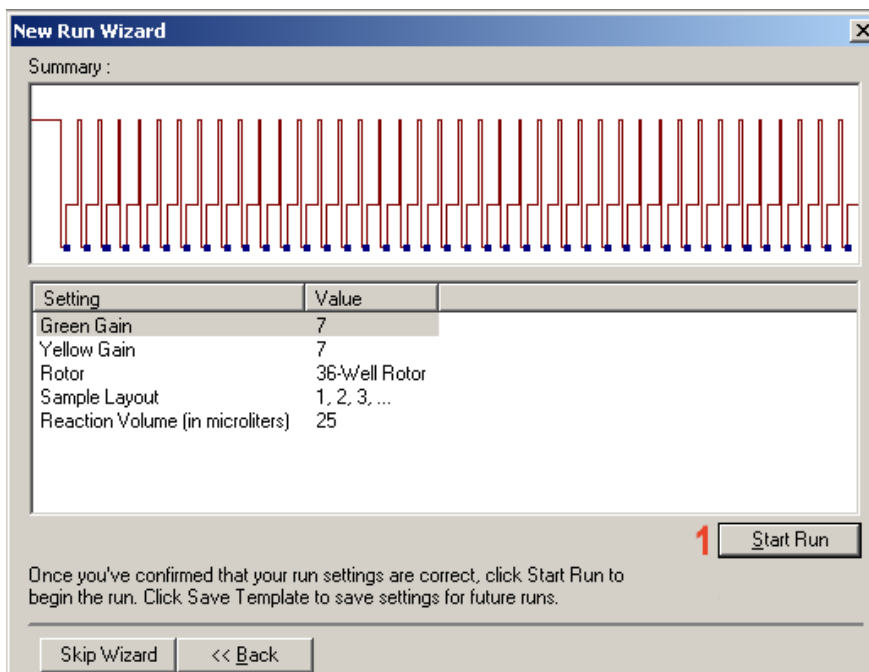
На вкладке **Advanced** (1) выбрать созданный ранее протокол (2) и дважды кликнуть по нему.



3.8. В списке (1) проверить тип ротора. Поставив флажок напротив Locking Ring Attached, подтвердить, что прижимное кольцо надето на барабан ротора. Нажать на кнопку **Next>** (2). Пропустить все последующие окна, нажимая **Next>** до появления последнего окна мастера:

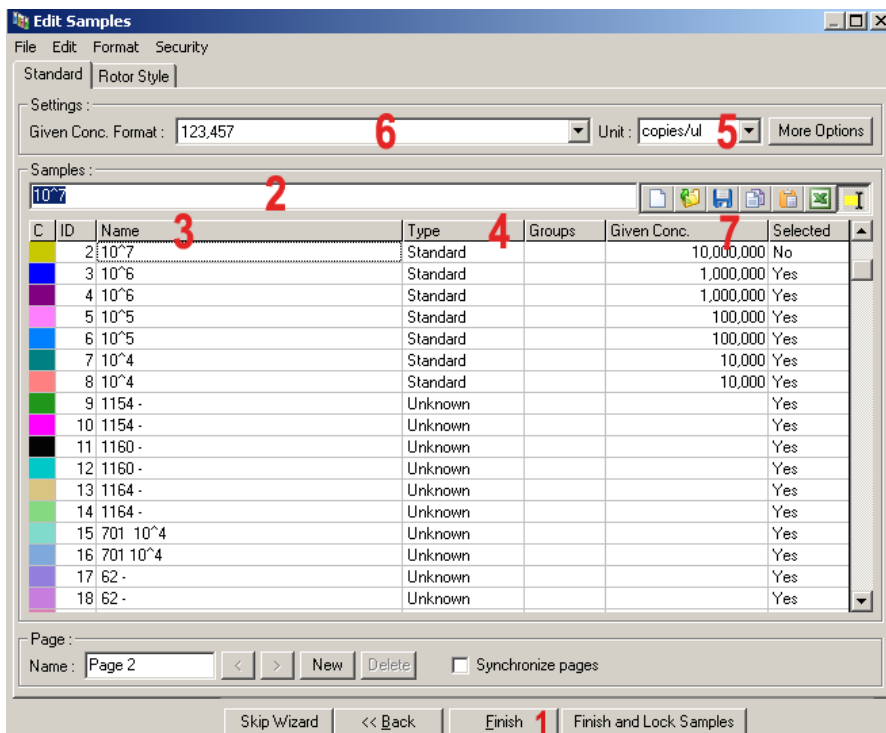


3.9. Убедиться, что все настройки соответствуют заданным и нажать кнопку **Start Run** (1). Программа запросит имя файла, в котором будет сохранён прогон.



3.10. Создание и редактирование протокола расположения образцов

С началом прогона программа выведет окно мастера редактирования расположения образцов в роторе:



Расположение и описание образцов можно полностью задать в предложенном окне мастера. Однако, эту операцию можно и отложить, проведя позже в любой момент прогона, после его окончания или при анализе полученных результатов. Для этого окно мастера следует закрыть нажатием на кнопку **Finish** (1).

Внимание! Заккрытие окна мастера нажатием кнопки **Finish and Lock Samples** приведет к фиксации введенной информации и невозможности ее дальнейшей корректировки. Использование этой кнопки допустимо только в том случае, если есть полная уверенность, что введенную информацию далее корректировать не придется!

Продолжить редактирование расположения и описания образцов можно из главного окна программы, когда ни один из мастеров не является активным. Для этого в правой части окна следует нажать кнопку **Edit Samples...**(10). Выдаваемое при этом окно является полным функциональным аналогом окна мастера.

Примечание. Вид и функциональное назначение поля (2) может значительно меняться в зависимости от того, для редактирования какого столбца оно используется.

3.7.1. Выделить в столбце Name (3) клетку, соответствующую положению редактируемого образца. В строке (2) задать название пробы.

3.7.2. Выделить в столбце Type (4) клетку, соответствующую положению редактируемого образца. Из выпадающего списка (2) выбрать тип образца:

Тип	Значение
None	отсутствие пробирки в гнезде
Unknown	исследуемый образец
Standard	стандартный образец с известной концентрацией
Positive Control	положительный контрольный образец
Negative Control	отрицательный контрольный образец

3.7.3. Если в постановке присутствуют стандартные образцы, то необходимо выполнить следующие действия:

- из списка **Unit**: (5) выбрать единицы измерения концентрации стандартов;
- из списка **Given Conc. Format**: (6) выбрать предпочтительный формат задания концентрации;
- в столбце **Given Conc.** (7) ввести концентрации для каждого стандартного образца.

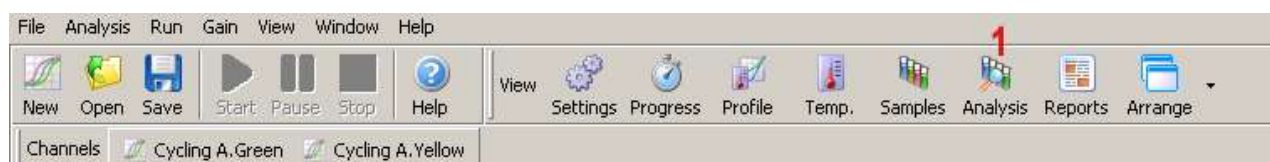
Внимание! Номера строк в списке образцов соответствуют номерам ячеек в роторе. **Строки, соответствующие пустым ячейкам ротора, не заполняются!**

3.7.4. Нажать Finish или OK.

4. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

5. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ



5.1. По окончании амплификации нажать в главном окне кнопку **Analysis** (1).

5.2. В появившемся окне **Analysis** выбрать вкладку **Quantitation** (2), выделить надпись **Cycling A Orange** (3) и нажать кнопку **Show** (4).

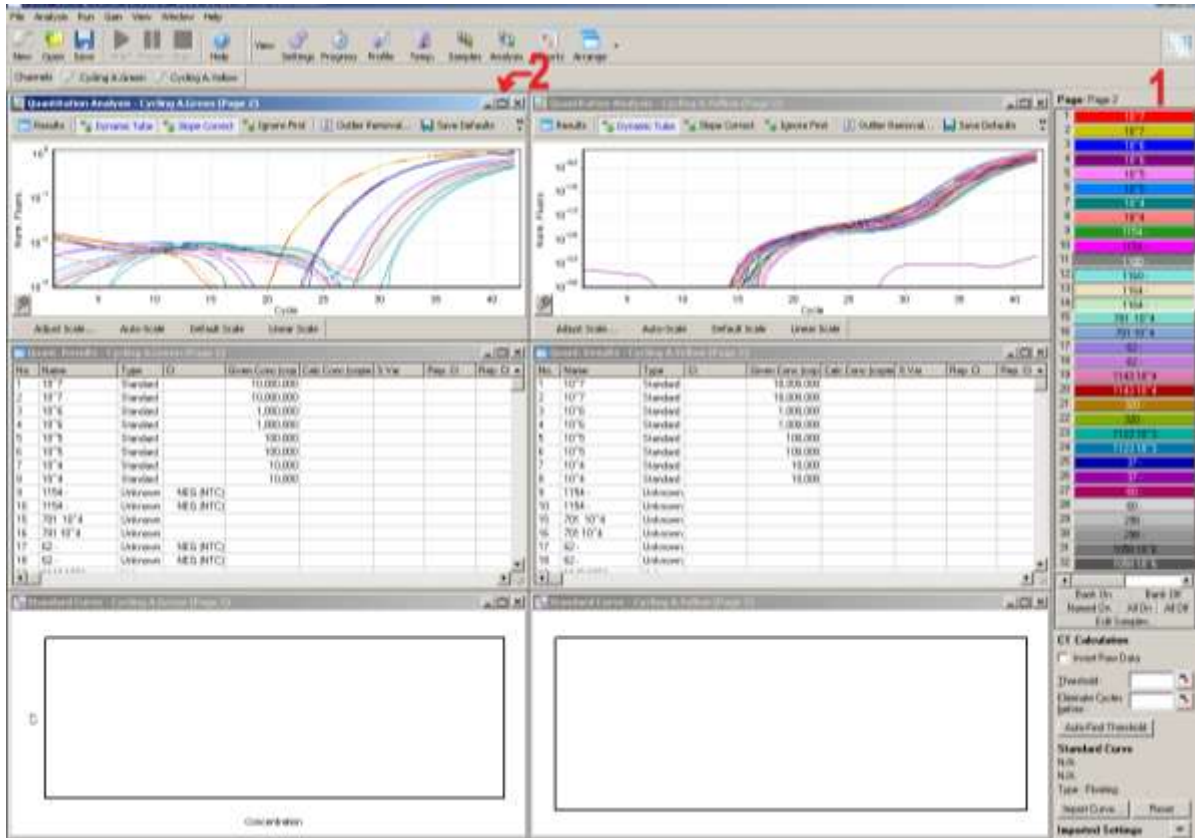
5.3. В окне **Analysis** на вкладке **Quantitation** (2), выделить надпись **Cycling A. Yellow** (3) и нажать кнопку **Show** (4).

5.4. В появившемся окошке с предложением выставить линию threshold автоматически (calculate automatic threshold) нажать Cancel.

5.5. Закрыть окно **Analysis**.

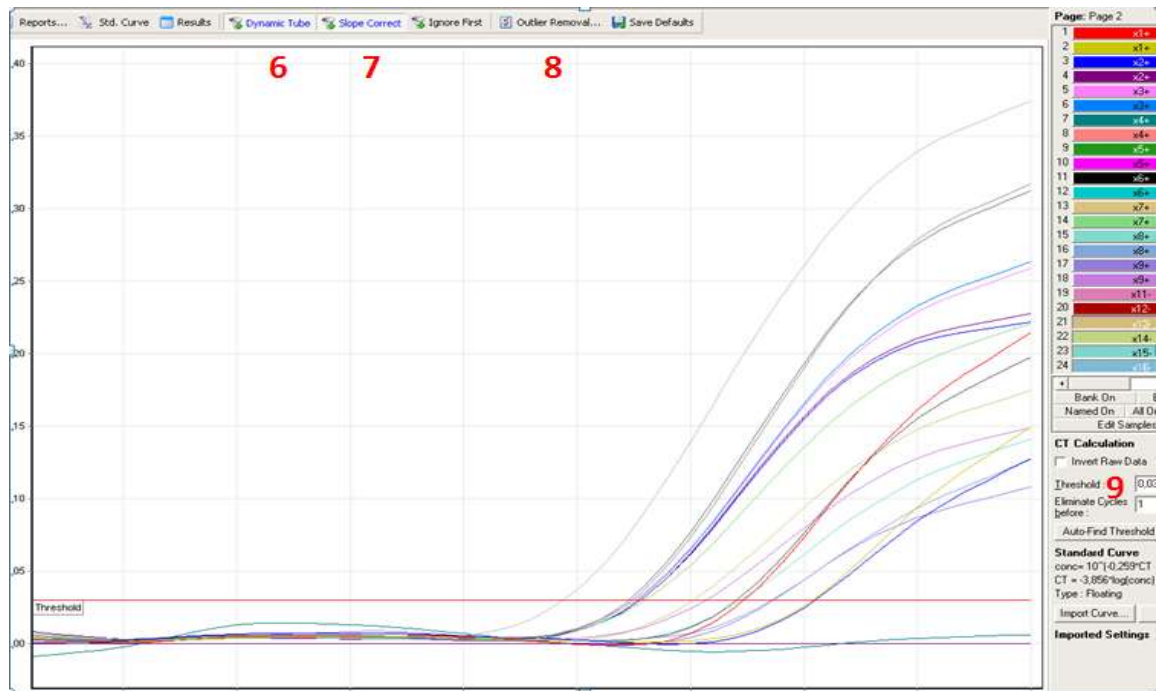


В главном окне программы появится 6 окон:



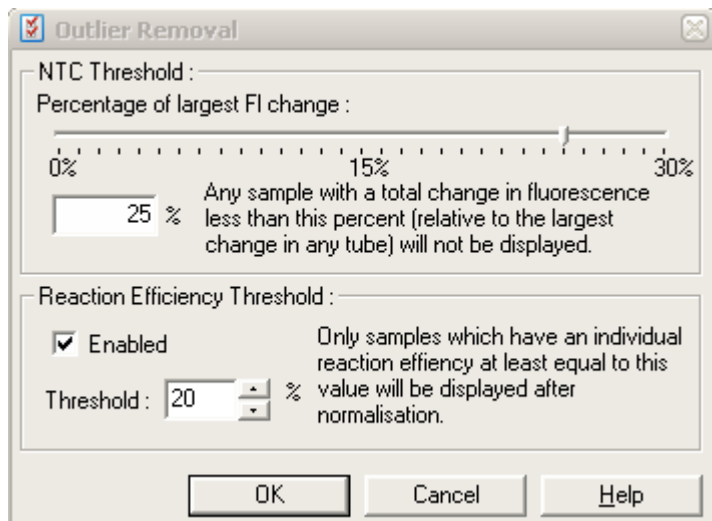
5.5. Сделать активными в поле (1) все образцы.

Сделать активными в поле все образцы, относящиеся к одному тесту.
Максимизировать окно **Quantitation Analysis – Cycling A. Orange**.



Установить следующие параметры обработки (см. рис.):

- кнопка **Dynamic Tube** (6) – нажата;
- кнопка **Slope Correct** (7) – нажата;
- кнопка **Outlier Removal** (8) – задать следующие значения:



Задать в поле **Threshold** (9) значение из таблицы – 0.03, соответствующее выбранному каналу и тесту. Провести анализ образцов.

Максимизировать окно **Quantitation Analysis – Cycling A. Yellow**.

Задать в поле **Threshold** (9) значение из таблицы – 0.03, соответствующее выбранному каналу и тесту. Провести анализ образцов.

Пороговая линия для отсечки шума и анализа, а также циклы выравнивания выбираются согласно таблице 4.

Таблица 4

	Канал	Threshold	Конечный цикл (КЦ)
Внутренний контроль	<i>Yellow</i>	0,03	40
HCV	Orange	0,03	45

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления фонового сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

9.1.2. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

	Ct ROX	Ct HEX	Результат
К+ ПЦР	<45	НЗ	Специфическая реакция прошла.
К+ выделени я	<45	<40	Выделение и специфическая реакция прошли.
К- ПЦР	НЗ	НЗ	Специфическая контаминация и контаминация внутренним контролем отсутствует.
	<45	НЗ	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ	<40	Контаминация внутренним контролем. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К- выделени я	НЗ	<40	Специфическая контаминация отсутствует.
	НЗ	>40	Ингибирование или недостаточное выделение РНК
	<45	<40	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
Анализируемый образец	<45	<40	ПРИСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	НЗ	<40	ОТСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	<НЗ или НЗ	НЗ или >40	Ингибирование или недостаточное выделение РНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct ROX– цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор ROX) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

НЗ – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано.

9.2. Анализ результатов для формата «количественный».

9.2.1. При проведении анализа с использованием наборов формата «количественный» необходимо ввести значения калибровочных проб в программе, предназначенной для анализа результатов. С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически определит циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией и рассчитает концентрации анализируемых образцов и контролей. Концентрация РНК HCV выражается в копиях/мл. Фактор пересчета между копиями РНК HCV и Международными единицами HCV составляет 2,7, в соответствии со вторым Международным стандартом WHO РНК HCV для тестов, основанных на определении нуклеиновых кислот (NIBSC 96/798).

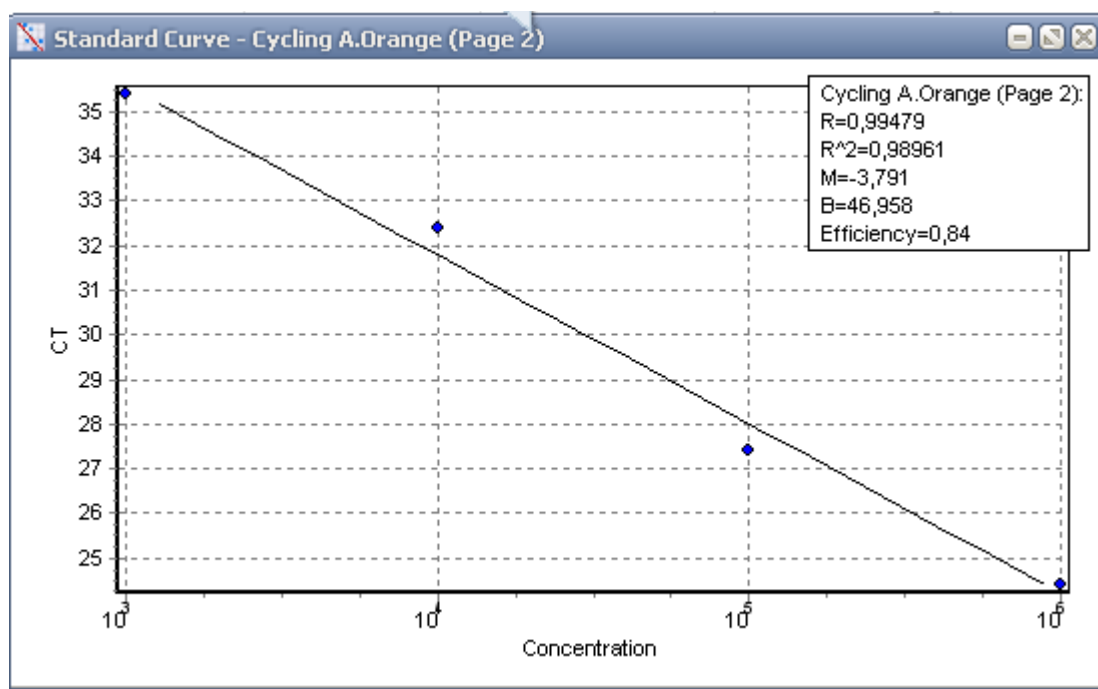
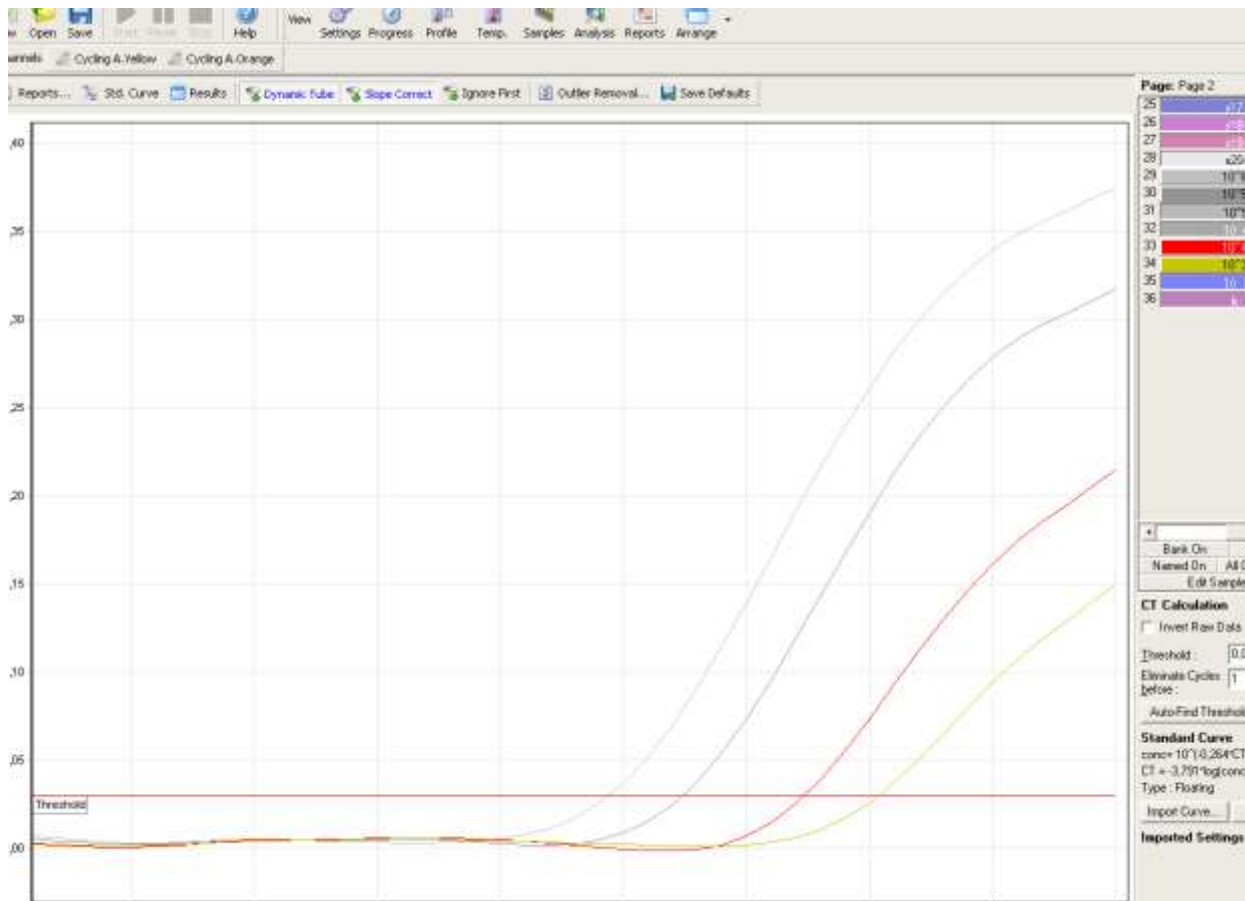


Рис 1. Кривые накопления флуоресцентного сигнала для калибровочных проб и построенный по ним калибровочный график.

Численное выражение концентрации показывает, что рассчитанное значение результата укладывается в линейный диапазон определения, составляющий $10^3 - 10^6$ копий /мл. Результаты, не укладывающиеся в данный диапазон, обладают высокой вариабельностью и не могут рассматриваться как точные.