

**РУКОВОДСТВО  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
ПОЛИГЕП-ТТВ с флуоресцентной детекцией  
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ  
(Real Time)**

**Формат ФЛУОРОПОЛ-РВ**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

### РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ПОЛИГЕП-TTV ФОРМАТА «ФЛУОРОПОЛ-РВ»

Назначение	3
Взятие, доставка и хранение клинического материала	3
Выделение ДНК	3
Условия хранения и эксплуатации набора	4
<b>РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «Icycler IQ5» (BioRad)</b>	
Общие сведения	4
Перед началом работы	4
Подготовка к постановке реакции амплификации	7
Постановка реакции амплификации	8
Создание рабочего протокола	9
Детекция продуктов амплификации	10
Анализ и интерпретация результатов	10
<b>РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «CFX 96» (BioRad)</b>	
Общие сведения	13
Перед началом работы	13
Подготовка к постановке реакции амплификации	15
Постановка реакции амплификации	17
Детекция продуктов амплификации	18
Анализ и интерпретация результатов	18

# РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ

## НАБОРА РЕАГЕНТОВ ПОЛИГЕП-ТТВ ФОРМАТА «ФЛУОРОПОЛ-РВ»

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ПОЛИГЕП-ТТВ-РВ» предназначен для качественного выявления ДНК ТТ-вируса в сыворотке или плазме крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с регистрацией продуктов амплификации в режиме реального времени на анализаторах iCycler IQ5 и CFX96 (Bio-Rad).

Набор предназначен только для применения *in vitro*.

Исследуемым материалом для анализа является плазма или сыворотка из цельной венозной крови, выделенная с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь».

### 2. 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. Закрывать 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.

### 3. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

**3.1.** Свежую или полностью размороженную сыворотку или плазму крови тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд.

**3.2.** Осадить капли на микроцентрифуге.

**3.3.** Внести 200 мкл сыворотки или плазмы крови в заранее приготовленную пробирку с 200 мкл реагента «ДНК-экспресс-кровь».

**3.4.** Тщательно перемешать импульсным вортексированием 10 секунд.

**3.5.** Осадить капли на микроцентрифуге.

**3.6.** Поместить в заранее прогретый до 98°C термостат и инкубировать при 98°C 20-25 минут.

**3.7.** Центрифугировать при 12-13 тыс.об./мин. при комнатной температуре в течение 1 минуты.

**3.8.** Супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

Обработанные таким образом пробы хранить при температуре -20°C в течение двух недель.

## 4. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**4.1.** Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до +25°C не более 5 сут.

**4.2.** Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре -18...-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 2,5 сут.

**4.3.** Срок годности наборов формата «базовый» – 6 месяцев, «One Step» - 4 месяца со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

**4.4.** Обработанные (прошедшие выделение ДНК) пробы можно хранить при температуре от +2...+8°C не более одной недели или при температуре -18... -20°C не более 6 месяцев.

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

По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ФЛУОРОПОЛ.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, дом 3А, стр. 2, телефон/факс: (495) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru

## 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 ПОЛИГЕП-ТТV используются каналы FAM (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 ПОЛИГЕП-ТТV. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции по использованию прибора или к его изготовителям.

### 2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

Перед первым использованием прибора с набором ПОЛИГЕП-ТТV необходимо выполнить следующие действия.

**2.1. Калибровка прибора по флуорофорам FAM и HEX.** Необходимо проводить с использованием пробирок того типа и того изготовителя, которые будут в дальнейшем использованы для постановки анализов при помощи набора ПОЛИГЕП-ТТV (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 ПОЛИГЕП-ТТV 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).

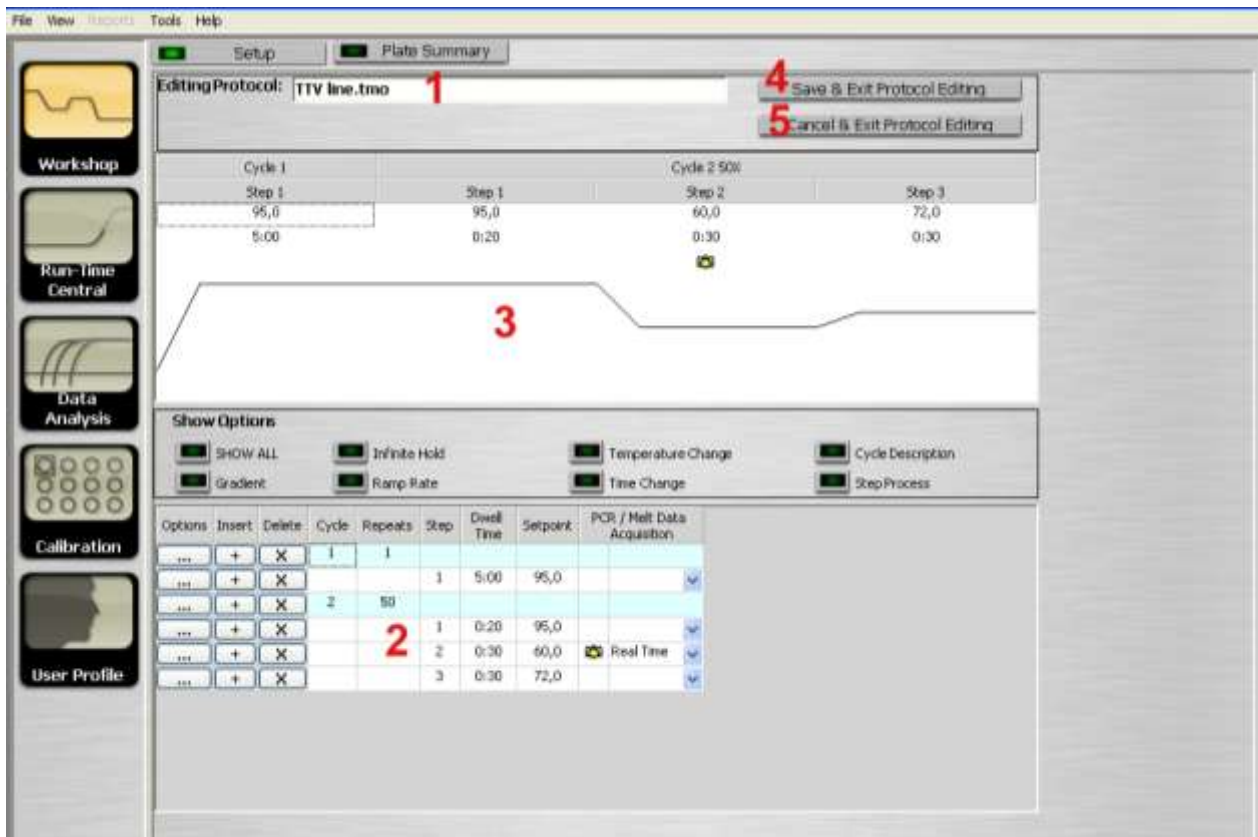
#### 2.2. Создание шаблона протокола амплификации.

**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	5:00	95,0	
...	+	X	2	50				
...	+	X			1	0:20	95,0	
...	+	X			2	0:30	60,0	Real Time
...	+	X			3	0:30	72,0	

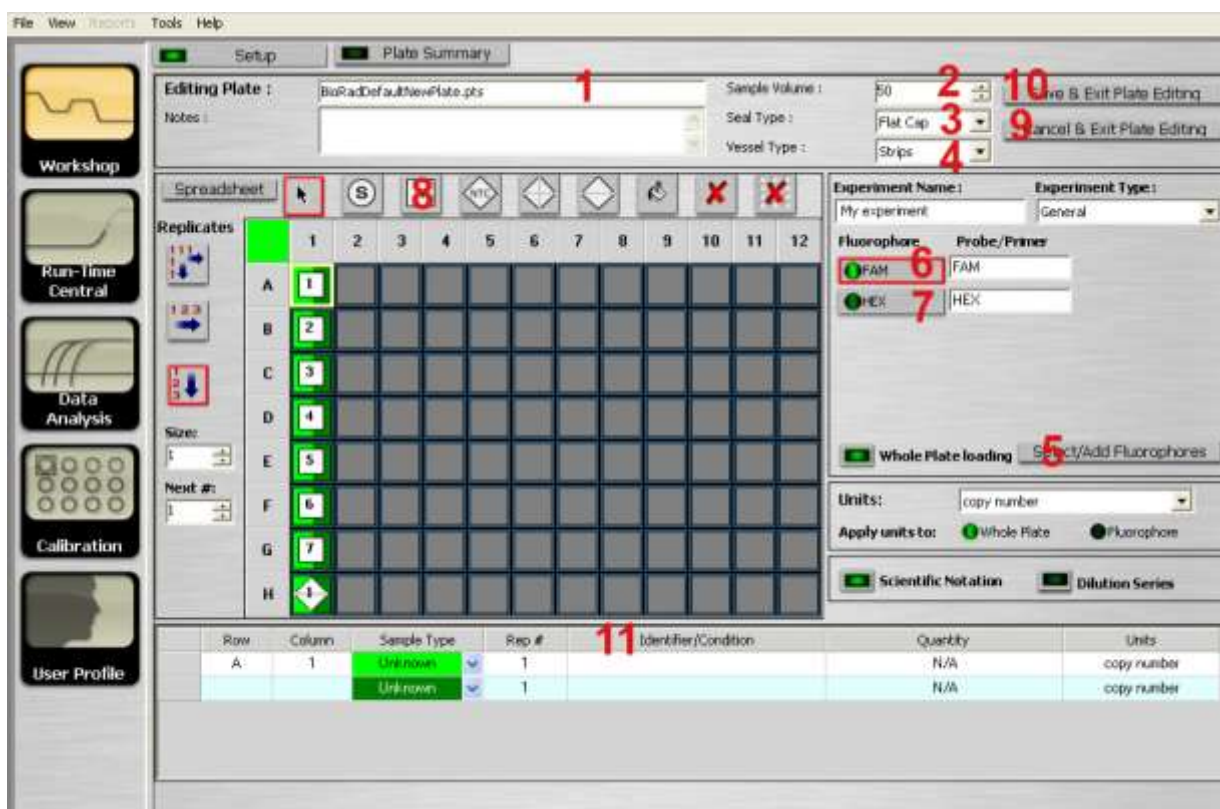
Шаг может быть удален кнопкой  или добавлен кнопками  и  (последний вариант предоставляет более широкие возможности). Кнопка  позволяет выбрать действие в шаге (пустая ячейка в столбце **PCR/Melt Data Acquisition** соответствует значению «none»). Для добавления/изменения численного значения в ячейке 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.

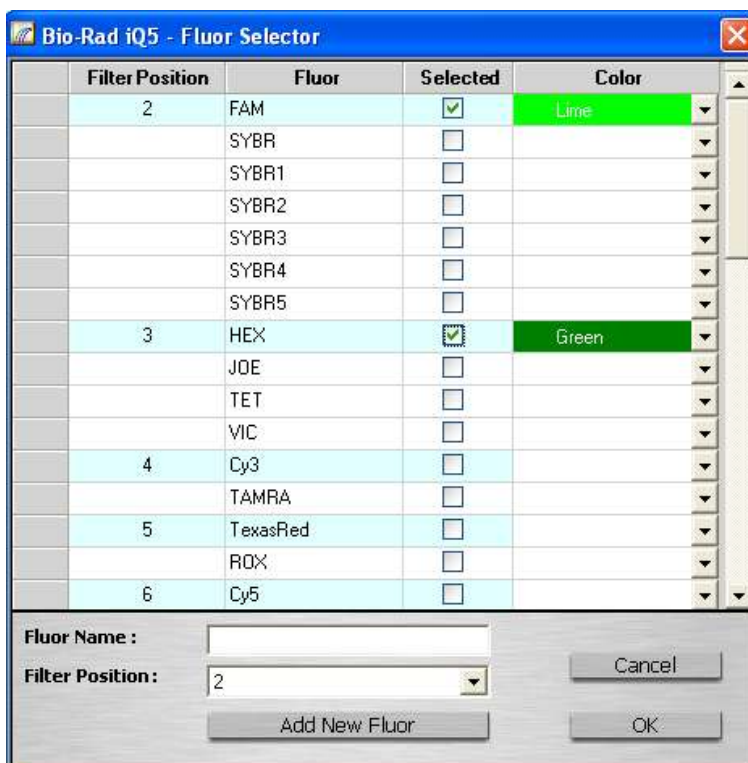
2.3.1. В главном окне программы (рис. в п. 2.2.1.) выбрать раздел **Workshop** (1), нажать на кнопку **Setup** (2). В окне (3) выбрать папку, куда будут сохранены шаблоны.

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.



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 FAM и HEX 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).

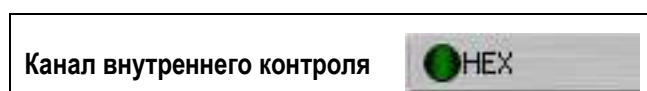
### 3. ПОДГОТОВКА К ПОСТАНОВКЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

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.
- 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. Комплектация «Нераскапанный».

**4.1.1.** 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!

**4.1.2.** За 20-30 мин до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

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

**4.1.3.** Приготовить рабочую смесь из расчета на 1 пробу

Разбавитель	35 мкл
10x реакционная смесь	5 мкл
Taq- полимераза	0,4 мкл

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

**4.1.4.** Внести в приготовленные пробирки по 40 мкл полученной рабочей смеси.

**4.1.5.** При необходимости добавить во все пробирки по 20 мкл минерального масла.

**4.1.6.** Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 10 мкл:

**а) в пробирку отрицательного контрольного образца** – разбавитель;

**б) в пробирки исследуемых образцов** – исследуемые образцы ДНК;

**в) в пробирку положительного контрольного образца** – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

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

**4.1.7.** Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+16...+ 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).

### 4.2. Комплектация «One Step».

**4.2.1.** Достать пробирки с амплификационной и фоновой смесями, положительным контролем и разбавителем из холодильника в соответствии с количеством анализируемых образцов.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе.

4.2.2. Пробирки с амплификационной смесью расставляются в соответствии с заранее подготовленным протоколом, где указаны номера анализируемых проб, а также пробирки положительного и отрицательного контроля. Маркировка пробирок не допускается!

4.2.3. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 10 мкл:

- а) в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контроль;
- б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

**ВНИМАНИЕ!** Фоновые пробирки (если они входят в комплект набора) полностью готовы к употреблению. Внесение в них каких-либо реактивов недопустимо!

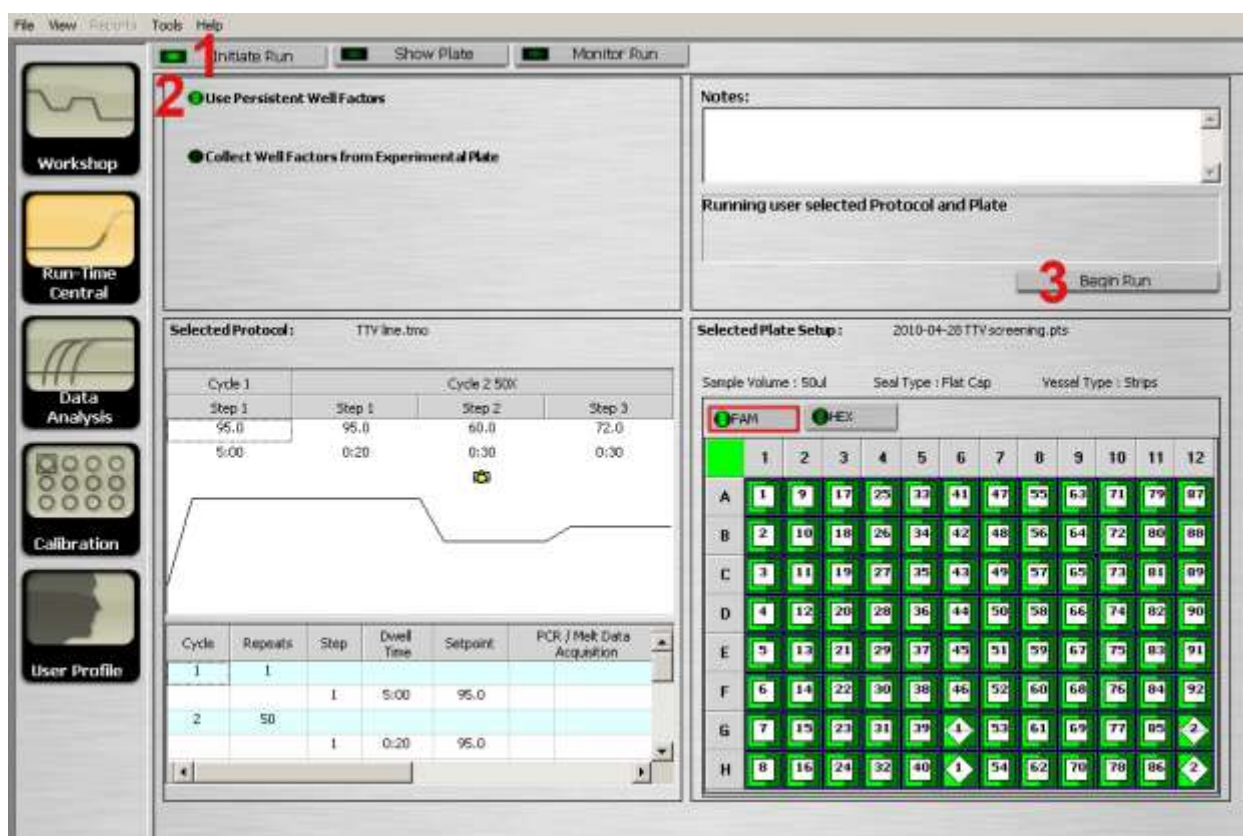
4.2.4. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+16...+ 25°C) на микроцентрифуге-вортксе (если используются плашки или стрипованные пробирки – на предназначенной для этого центрифуге; значение угловой скорости (об/мин) в этом случае 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.

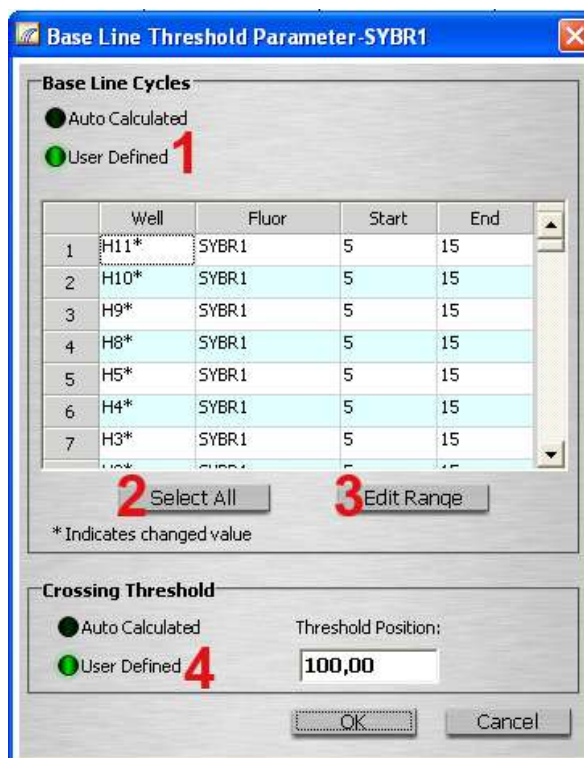
### 7.2. Структура окна анализа

- (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;



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

7.4. Кнопками (4) и (5) выставить активным (обведенным зеленой рамочкой) только канал FAM. 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 15 (ending cycle). Для пересечения с пороговой линией (**Crossing Threshold**) в поле **Threshold Position**, нажав кнопку (4), указать значение 100.

7.5. Повторить действия из пункта 6.4 для канала HEX, выставив значение **Threshold Position 50**.

**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.

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 **FAM** (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 анализа 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;

	<b>Ct FAM</b>	<b>Ct HEX</b>	<b>Результат</b>
<b>Исследуемый образец</b>	любой	до 40	присутствие ДНК возбудителя
		после 40	присутствие ДНК возбудителя, конкуренция между системами специфики и внутреннего контроля. Перестановка не требуется
	N/A	до 40	отсутствие ДНК возбудителя
		после 40	Ингибирование. Требуется повтор анализа данного образца
<b>Положительный контрольный образец</b>	любой	любой	присутствие ДНК возбудителя
	N/A	любой	Аmplификация не прошла: невнесение положительного контрольного образца, нарушение методики постановки, некорректная работа тест-системы
<b>Отрицательный контрольный образец</b>	N/A	до 40	специфическая контаминация отсутствует
		после 40	Возможны нарушения методики постановки или некорректная работа системы внутреннего контроля
	любой	до 40	Специфическая контаминация. Требуется повтор постановки и принятие антиконтаминационных мер

# 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 ПОЛИГЕП-ТТV-РВ используются каналы FAM (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 ПОЛИГЕП-ТТV-РВ. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции производителя прибора.

## 2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

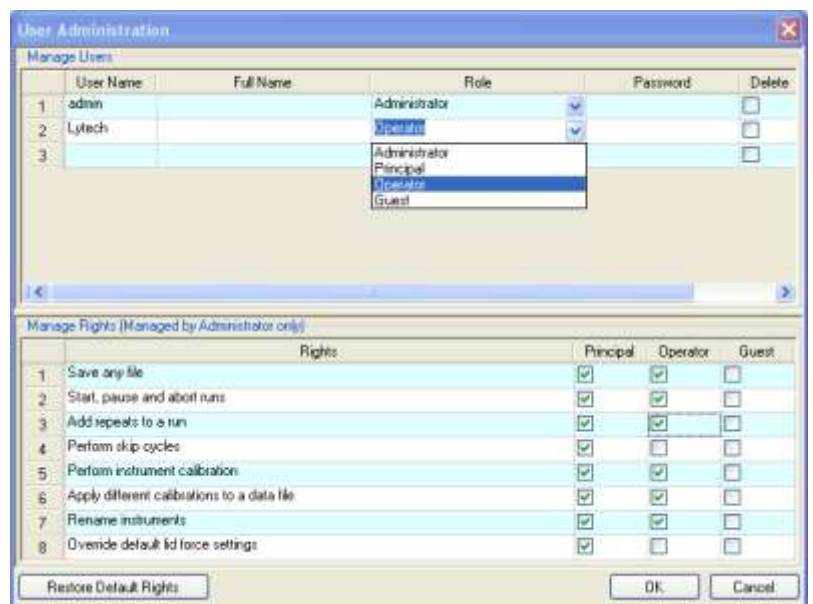
Перед первым использованием прибора с наборами ПОЛИГЕП-ТТV-РВ необходимо выполнить следующие действия:

**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 введённых 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**,

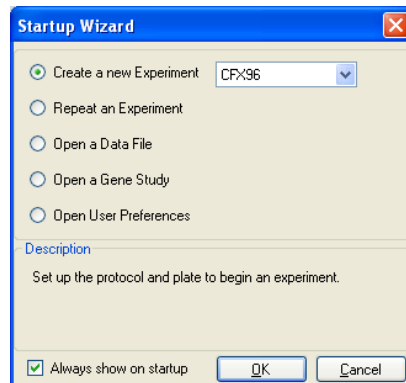



либо нажав кнопку  в основном окне управляющей программы (программа также начнёт выдавать это окно при загрузке). В появившемся окне следует выбрать пользователя из списка и, при необходимости, ввести пароль.



## 2.2. Создание протокола амплификации.

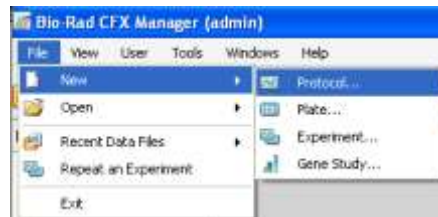
2.2.1. При запуске программы появляется окно выбора основных операций – **Startup Wizard**. Следует отметить верхнюю позицию – Создать новый эксперимент - **Create a new Experiment** и нажать кнопку **Ok**. В появившемся окне **Experiment Setup** выбрать вкладку **Protocol** и в ней нажать **Create New...**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



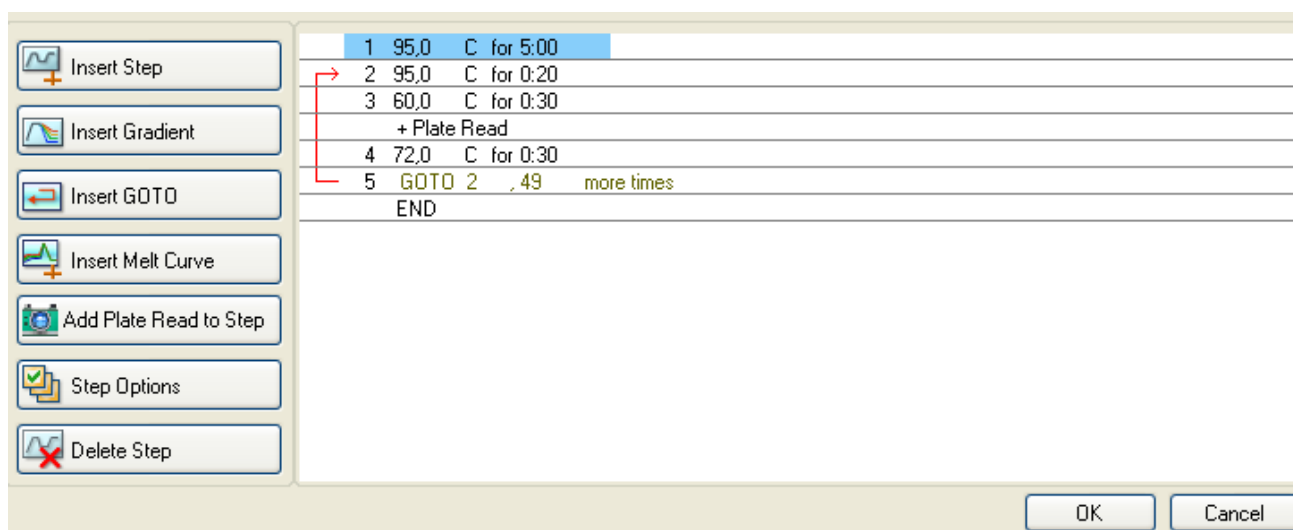
Окно **Protocol Editor** можно также вызвать кнопкой  на панели задач главного окна,



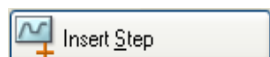
либо меню **File**, подменю **New**, пункт **Protocol...**



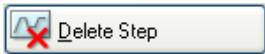
### 2.2.2. Создать протокол амплификации, соответствующий представленному на рисунке



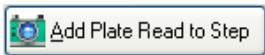
используя следующие клавиши:



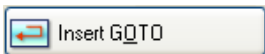
- добавляет шаг после текущего, если в поле **Insert Step** выбрано **After** и перед текущим, если в поле **Insert Step** выбрано **Before**



- удаляет текущий шаг



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



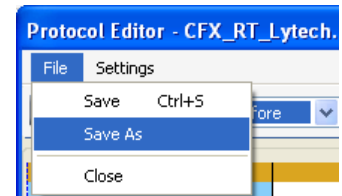
- добавляет возврат к шагу, начинающему цикл. В этом шаге указываются следующие значения:

**Goto 2** , - номер шага, являющегося первым в цикле

**49 more times** - число возвратов (указывается значение на 1 меньше числа циклов в протоколе; для 40 циклов будет 39 возвратов)

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


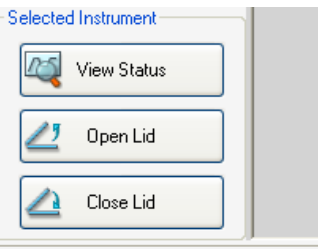
**2.2.3.** Для сохранения протокола следует выбрать в меню File пункт Save As. Программа предложит ввести имя протокола и сохранит его по умолчанию в папке текущего пользователя.



### 3. ПОДГОТОВКА К ПОСТАНОВКЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ


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

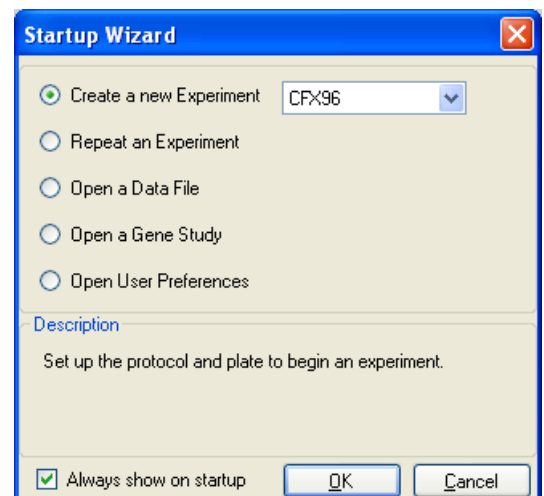
**3.2.** Запустить управляющую программу. Дождаться окончания процедуры установления связи с прибором. При этом в левой части главного окна программы появятся:

<p>а) В рамке <b>Detected Instruments</b> – номер прибора</p> 	<p>б) Рамка <b>Selected Instrument</b></p> 
<p>в) В строке состояния отразится состояние прибора <b>Idle</b> →</p>	

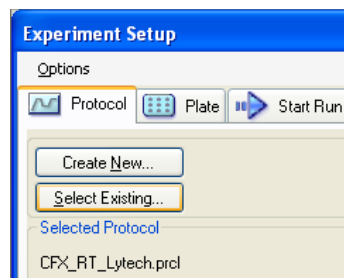
**3.3.** Запустить окно **Experiment Setup** любым из следующих способов:

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.



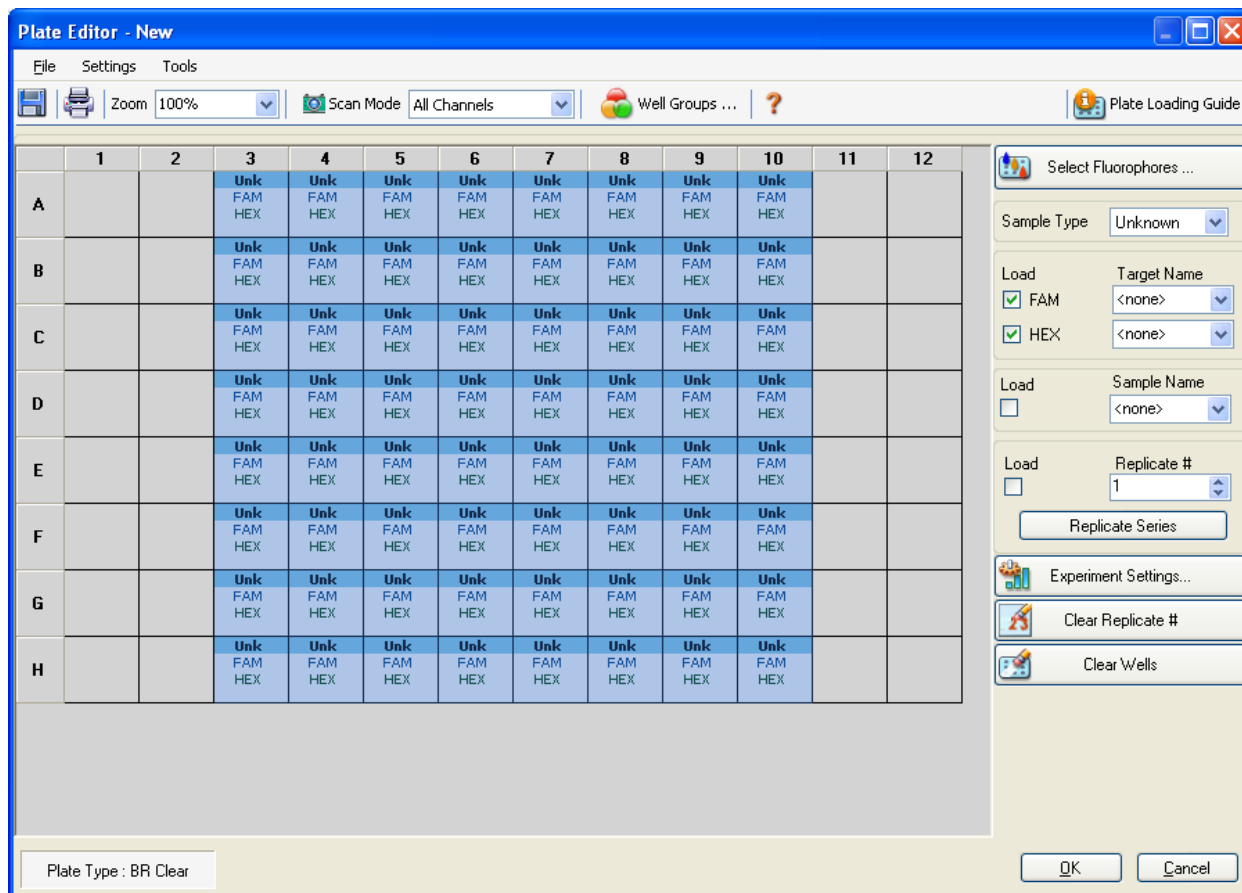
**3.5.** Нажать **Next>>** или выбрать вкладку **Plate**.

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



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

3.7.2. Для создания новой схемы удобней выделить прямоугольник, охватывающий все лунки, в которых будут располагаться образцы. Установить для них тип образцов **Unknown**, затем отметить флуорофоры FAM и HEX.

3.7.3. Выделить расположения положительных контрольных образцов (это удобно делать с нажатой клавишей **Ctrl**). Установить для них тип образцов **Positive Contpol**.

3.7.4. Выделить расположения отрицательных контрольных образцов (это удобно делать с нажатой клавишей **Ctrl**). Установить для них тип образцов **Negative Contpol**.

3.7.5. Для удаления образцов их надо выделить и нажать кнопку **Clear Wells**.

3.7.6. Проверить, чтобы был выбран режим сканирования по всем каналам **Scan Mode All Channels**.

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

## 4. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

### 4.1. Комплектация «Нераскапанный».

4.1.1. 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!

4.1.2. За 20-30 мин до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

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

4.1.3. Приготовить рабочую смесь из расчета на 1 пробу

Разбавитель	35 мкл
10x реакционная смесь	5 мкл
Taq- полимеразы	0,4 мкл

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

4.1.4. Внести в приготовленные пробирки по 40 мкл полученной рабочей смеси.

4.1.5. При необходимости добавить во все пробирки по 20 мкл минерального масла.

4.1.6. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 10 мкл:

а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

в) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

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

4.1.7. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+16...+ 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).

### 4.2. Комплектация «One Step».

4.2.1. Достать пробирки с амплификационной и фоновой смесями, положительным контролем и разбавителем из холодильника в соответствии с количеством анализируемых образцов.

*При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе.*

4.2.2. Пробирки с амплификационной смесью расставляются в соответствии с заранее подготовленным протоколом, где указаны номера анализируемых проб, а также пробирки положительного и отрицательного контролей. Маркировка пробирок не допускается!

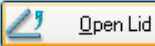

4.2.3. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 10 мкл:

а) в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контроль;

б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

**в) в пробирку положительного контрольного образца** – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

**4.2.4.** Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250–4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+16...+ 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).

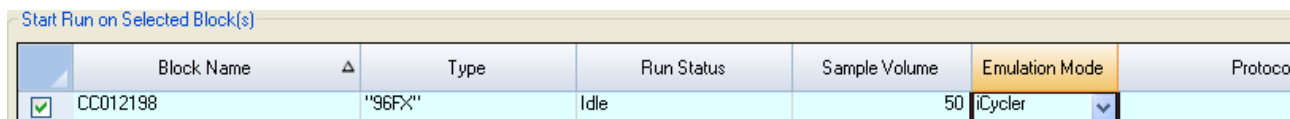
**4.3.** Открыть крышку системы для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени при помощи кнопки на корпусе или кнопки  на вкладке **Start Run** окна **Experiment Setup**. Перенести пробирки в прибор в точном соответствии заданной схеме расположения образцов. Закрыть крышку нажатием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

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



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




**4.6.** 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.

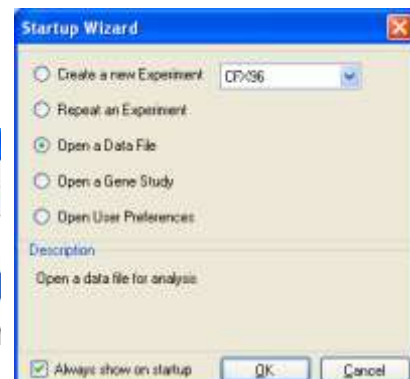
## 5. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

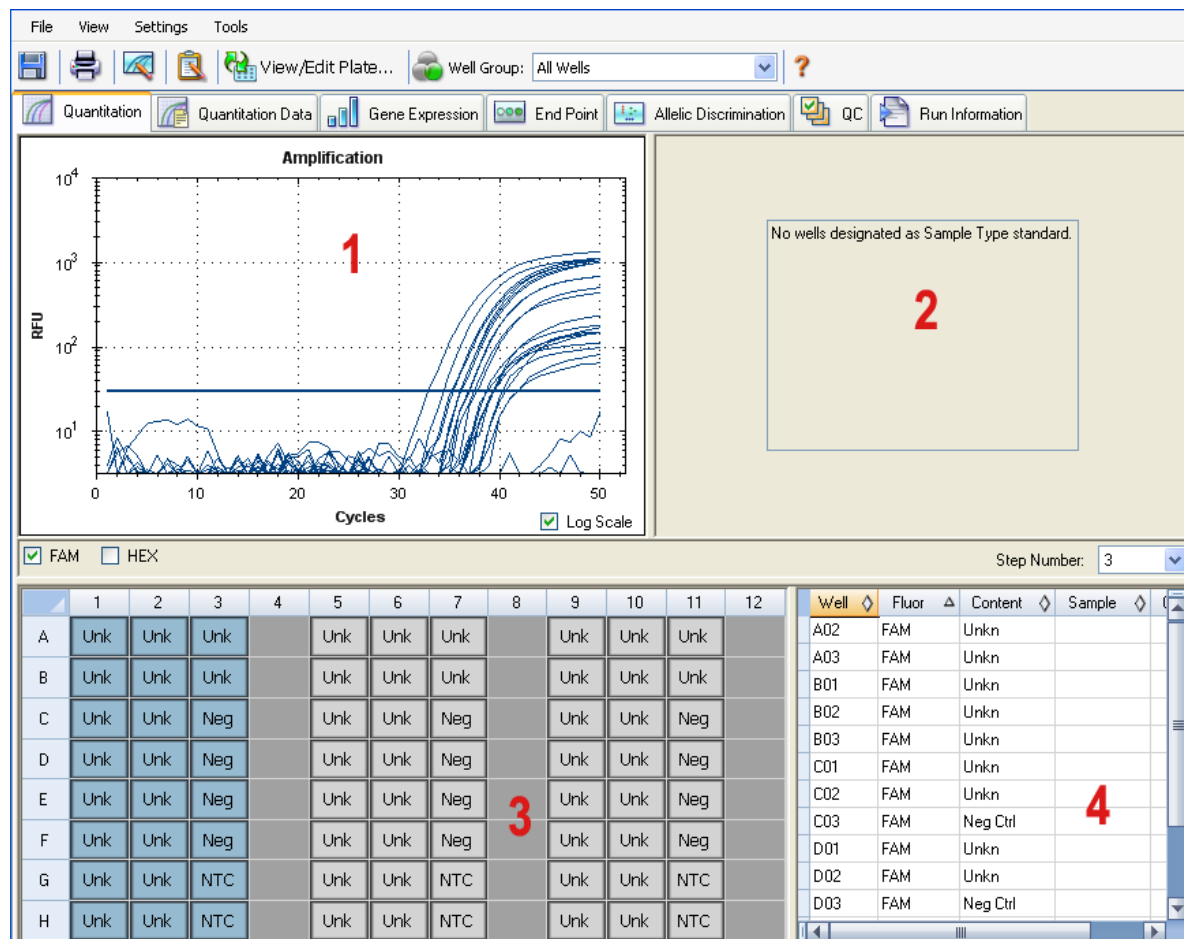
окне **Startup Wizard**, выбора пункта **Data File** в подменю **Open** меню **File** в главном окне программы или нажатием кнопки .



## 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.

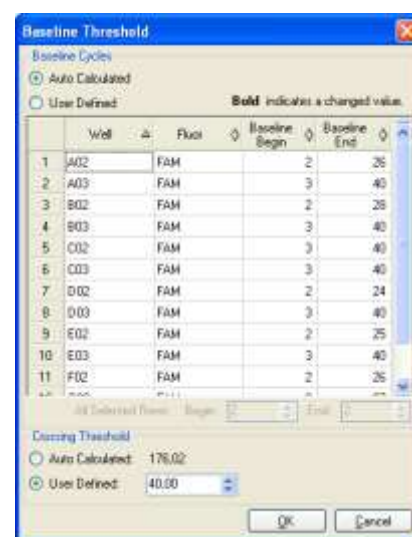


6.3. Отметить флуорофор HEX и снять галочку с флуорофора FAM.

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 30\*. Нажать **OK** для принятия внесённых изменений.


6.4. Отметить флуорофор FAM 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 специфического сигнала 30\*.



\* - **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.

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

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 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;

	<b>Ct FAM</b>	<b>Ct HEX</b>	<b>Результат</b>
<b>Исследуемый образец</b>	любой	до 40	присутствие ДНК возбудителя
		после 40	присутствие ДНК возбудителя, конкуренция между системами специфики и внутреннего контроля. Перестановка не требуется
	N/A	до 40	отсутствие ДНК возбудителя
		после 40	Ингибирование. Требуется повтор анализа данного образца
<b>Положительный контрольный образец</b>	любой	любой	присутствие ДНК возбудителя
	N/A	любой	Аmplификация не прошла: невнесение положительного контрольного образца, нарушение методики постановки, некорректная работа тест-системы
<b>Отрицательный контрольный образец</b>	N/A	до 40	специфическая контаминация отсутствует
		после 40	Возможны нарушения методики постановки или некорректная работа системы внутреннего контроля
	любой	до 40	Специфическая контаминация. Требуется повтор постановки и принятие антиконтаминационных мер