

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ (PPCC-E/A) МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (РВ-ОТ/ПЦР)

РВ-ОТ/ПЦР-PPCC.E/A (полный комплект на 50 реакций)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор – «РВ-ОТ/ПЦР-PPCC.E/A» – предназначен для количественного определения РНК вируса PPCC (Штаммы: Европейский и Американский) свиней в образцах сыворотке/цельной крови, в продуктах питания свиного происхождения, а также в образцах патологического материала методом последовательной амплификации синтезированных фрагментов кДНК вируса PPCC с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов «РВ-ОТ/ПЦР-PPCC.E/A» может быть использован в лабораторной диагностике вирусных инфекций, эпизоотическом надзоре и научных исследованиях.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода основан на использовании Полимеразной Цепной Реакции, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации двуцепочечной молекулы ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров NS-Taq полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается применением «Hot-Start» Tag-полимеразы, которая исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при раскапывании и начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены кДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления 5' концевой метки.

Исследование с использованием набора реагентов «РВ-ОТ/ПЦР-PPCC.E/A» состоит из следующих двух этапов: выделение РНК (пробоподготовка), Обратная Транскрипция и ПЦР-амплификация полученной кДНК PPCC в режиме реального времени.

В состав кДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой РНК, включены флуоресцентные метки HEX и Cy5. В состав кДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации внутреннего контроля (геном свиньи), входит флуоресцентный краситель FAM. (Таблица. 1.).

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Набор реагентов «РВ-ОТ/ПЦР-PPCC.E/A» включает образцы стандартов кДНК PPCC в концентрациях:

PPCC.E СТ2 кДНК: 5×10^8 - 1×10^8 копий/мл и PPCC.A СТ2 кДНК: 5×10^7 - 1×10^7 копий/мл

Таблица. 1. Каналы детекции продуктов амплификации.

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
ВКО	PPCC.E	-	PPCC.A	-

2.2. Набор включает 1 комплект реагентов - для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени. **В состав набора входят:**

✓ **Калибровочные образцы (Стандарты)** включают:

- РРСС.Е СТ2 кДНК ($5 \times 10^8 - 1 \times 10^8$ копий/мл) – 1 пробирка (**100** мкл) – **красная** крышка;
- РРСС.А СТ2 кДНК ($5 \times 10^7 - 1 \times 10^7$ копий/мл) – 1 пробирка (**100** мкл) – **оранжевая** крышка;
- Отрицательный контроль (КО⁻) – 1 пробирка (**100** мкл) – **зеленая** крышка.

✓ **Комплект реагентов для ПЦР-амплификации** включает:

- Смесь для амплификации «**Микс РРСС.Е/А Отр**» – 1 пробирка (**850** мкл) – **желтая** крышка;
- Смесь для амплификации «**Микс РРСС.Е/А ПЦР**» – 1 пробирка (**850** мкл) – **сиреневая** крышка;
- Фермент **M-MLV ревертаза** – 1 пробирка (**30** мкл) – **синяя** крышка.

2.4. Время проведения анализа – приблизительно **2** часа. + **20** минут на Экстракцию РНК.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В образцах, содержащих РНК вируса РРСС, определяется концентрация вируса в исследуемом материале. В образцах, не содержащих РНК вируса РРСС, результат исследования должен быть отрицательным.

Чувствительность анализа: не менее 1×1000 копий на 1,0 мл цельной крови или 1 гр исследуемого материала.

Линейный диапазон концентраций РНК вируса РРСС, определяемых детектирующим амплификатором, составляет $1 \times 10^3 - 1 \times 10^{12}$ копий/мл образца.

Коэффициент вариаций результатов определений – не более 7%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Зона 1: Постановка ПЦР-реакции:

- ✓ Амплификатор детектирующий (RotorGene и BioRad);
- ✓ Центрифуга с ускорением не менее 13000 g;
- ✓ Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40–95 °С;
- ✓ Микроцентрифуга/вортекс;
- ✓ Холодильник бытовой с морозильной камерой;
- ✓ Пробирки типа Эппендорф одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- ✓ Штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл, 0,2 мл;
- ✓ Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- ✓ Одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- ✓ Одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;

- ✓ Контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Материалом для исследования служат: цельная кровь/плазма/ликвор, мазки и смывы носа/зева/слюны, пат материал (куски тканей павших животных) и продукты питания свиного происхождения, а также фекалии и секционный материал:

- **Цельная Кровь/Плазма/Ликвор:**

- ✓ Для выделения следует брать **150 – 200** мкл цельной крови/сыворотки/плазмы. **Опционально:** При выделении из крови/сыворотки/ликвора можно использовать внешний стандарт **ДНК ВКО**, особенно если материал мог быть подпорчен, поскольку в жидкой среде априори содержится меньше клеток, чем в тканях и мазках.

Взятие образцов периферической крови: Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта, потому что этот реагент ингибирует ПЦР реакцию.

- **Смывы/Мазки из ушей, полости носа, ротоглотки, зева и слюны:**

- ✓ Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Зонд с ватным тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа, затем опускают вниз и вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.
- ✓ После забора зонд помещают в сухую стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл «Транспортной среды» любого производителя или же 800 мкл обычного физ. раствора. Отрезать ватный тампон от зонда и поместить в подготовленную среду, после этого сразу заморозить. На исследование следует брать **150-200** мкл среды, предварительно как следует перемешав ее на вортексе или тщательным пипетированием.

- **Фекалии/Секционный материал:**

- ✓ Фекалии.
Используют пробы фекалий массой (объемом) 1-2 г (1-2 мл). Пробу в количестве 1 грамма (примерно) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный флакон. Перед проведением Экстракции пробу растворяют в 1 мл физ. раствора и после тщательного перемешивания на исследование берут **150-200** мкл.
- ✓ Секционный материал
Секционный материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и замораживают сразу после взятия либо исследуют в течении 1 ч. Дальнейшее хранение материала возможно в течении 1 года при температуре не выше минус 68°С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. На исследование брать **150-200** мкл.

- **Патологический материал и продукты питания**

- ✓ На выделение берут соскобы с поверхности тканей в объеме **1 – 2** спичечных головок (**0,05 – 0,1** гр или **50 – 100** мкг). Соскоб можно поместить непосредственно в **Лизирующий Раствор**.

- ✓ Или взять **1** гр пат материала или готового продукта свиного происхождения и добавить **5** мл обычного физ. раствора или дистиллята, тщательно гомогенизировать в фарфоровой ступке. После, отобрать **150 – 200** мкл полученного Гомогената и поместить в **Лизирующий Раствор**.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Экстракцию **РНК** из клинического материала можно проводить практически любыми наборами, предназначенными для выделения/экстракции нуклеиновых кислот из биологических образцов. Однако, считаем нужным предупредить !!!, что наборы разных производителей могут довольно сильно отличаться друг от друга. Мы отработывали некоторые из них и можем с уверенностью заявить, что ПЦР-набор «**РВ-ОТ/ПЦР-РРСС.Е/А**» полностью совместим с наборами для выделения следующих производителей:

- **Интерлаб Сервис** – «**РИБО-сорб**» и «**РИБО-преп**»
- **Вет Фактор** – «**ДНК/РНК-С-фактор**» и «**ДНК-С-фактор**»

Или же с набором компании **ВМТ**:

- **ВМТ** – «**РНК-СиликаСпин-Преп**»

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЙ ЭТАПА ВЫДЕЛЕНИЯ РНК (ВМТ – «РНК-СиликаСпин-Преп»)

- 1** Раствор для лизиса – **Раствор I** (если хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре **65 °С** до полного растворения кристаллов.
- 2** Добавьте **500-600** мкл **Раствора I** к исследуемому материалу. Тщательно перемешайте на вортексе.
- 3** Инкубируйте микропробирки со смесью **10-15** минут при комнатной температуре. Если смесь лизировалась не полностью (Материала было слишком много !!! например из кусочков тканей), то пробирку нужно центрифугировать **5** минут (~ **12-13 000** об/мин).
- 4** Перенесите **800** мкл смеси **лизата** в чистую подписанную **Спин-колонку** (Входит в комплект набора «РНК/ДНК-СиликаСпин-Преп») или же добавьте к ней **25-30** мкл **Сорбента** (Входит в комплект набора «РНК/ДНК-Силика-Преп»). Проведите центрифугирование в течение **1-2** минуты на макс. оборотах. Слейте/Удалите жидкость из собирающей пробирки.
- 5** Одним носиком добавьте в каждую спин-колонку по **400** мкл **Раствора II**. Центрифугировать в течение **1-2** минуты (~ **10-12 000** об/мин). Слейте/Удалите жидкость из собирающей пробирки.
- 6** Одним носиком добавьте в каждую спин-колонку по **500** мкл **Раствора III**. Центрифугировать в течение **1-2** минуты (~ **10-12 000** об/мин). Слейте/Удалите жидкость из собирающей пробирки.
- 7** Слейте/Удалите жидкость из собирающей пробирки. И проведите короткое центрифугирование еще раз для удаления остатков **Раствора III**.
- 8** Добавьте в самый центр колонки по **70** мкл **Раствора IV**. Инкубируйте **1** минуту при **NT** и центрифугируйте в течение **1-2** минуты (~ **10-12 000** об/мин).

Препарат РНК довольно стабилен, но мы рекомендуем сразу же убрать пробы на +4 С или же на – 20 С для длительного хранения.

Теперь пробы РНК вируса РРСС готовы к постановки Обратной Транскрипции.

7.2. Подготовка и проведение реакции Обратной Транскрипции (Об-Тр):

7.2.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок/лунок для исследуемых образцов и отрицательного контрольного образца «КО». Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Общее количество пробирок получается – 11.

НО !!! Мы не рекомендуем !!! Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов !!!

7.2.2. Разморозьте при комнатной температуре (18–25 °С) «Микс РРСС.Е/А Отр» из комплекта реагентов.

7.2.3. Аккуратно пипетируя, перемешайте пробирку со смесью «Микс РРСС.Е/А Отр» наконечником на 1000 мкл с фильтром 15-20 раз. Пройдитесь наконечником по внутренним стенкам пробирки несколько раз для того, чтобы смыть ПЦР-смесь с них. Раствор должен стать полностью однородный.

Не на вортесе !!! ВАЖНО !!! Ферменты подвергаются механическим повреждениям !!!

7.2.4. Приготовьте «Микс РРСС.Е/А Отр» и фермент «M-MLV ревертаза».

Смешайте в отдельной пробирке:

- 15 × (N+1) мкл Микс РРСС.Е/А Отр
- 0,5 × (N+1) мкл M-MLV ревертаза

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «КО» и «СТ2».

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 13 (В двух повторностях – 26)

Микс РРСС.Е/А Отр : 15 x (11+1) = 180 мкл

M-MLV ревертаза : 0,5 x (11+1) = 6 мкл

7.2.5. Аккуратно пипетируя, добавьте во все промаркированные пробирки/луночки по 15 мкл приготовленной смеси наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.6. Встряхните пробирки с препаратом РНК (можно на вортесе – 10-20 секунд) и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3 – 5 сек.

7.2.7. Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты РНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите по 10 мкл полученного из образцов препарата РНК в соответствующие пробирки/луночки для исследуемых образцов (по 2 шт для каждого образца – в случае необходимости проведения исследования в двух повторностях) наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.8. Внесите по 10 мкл Отрицательного Контроля (КО) в пробирки/луночки наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.9. Центрифугируйте пробирки при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек при комнатной температуре (18–25 °С).

7.2.10. Установите все пробирки в блок/ротор амплификатора детектирующего или обычного (He Real-Time). Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

Таблица. 2. Температурный режим для реакции Обратной Транскрипции

№ стадии	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	25	5	00	1		Цикл
2	42	20	00	1		Цикл
3	4-10		Хранение

По окончании реакции достаньте пробирки/стрипы из термоблока и добавьте в каждую имеющуюся пробу по 30 мкл mQ H₂O и перемешайте.

Теперь пробы кДНК вируса РРСС готовы к постановки ПЦР Реакции.

7.3. Подготовка и проведение Полимеразной Цепной Реакции (ПЦР):

7.3.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок/лунок для исследуемых образцов, положительного калибровочного образца ДНК «СТ2» и отрицательного контрольного образца «КО». Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Нужно промаркировать 10 пробирок/лунок для исследуемых образцов; 1 пробирку для «КО»; 2 пробирки для двух стандартов «СТ2». Общее количество пробирок получается – 13.

НО !!! Мы не рекомендуем !!! Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов !!!

7.3.2. Разморозьте при комнатной температуре (18–25 °С) «Микс РРСС.Е/А ПЦР» из комплекта реагентов.

7.3.3. Аккуратно пипетируя, перемешайте пробирку со смесью «Микс РРСС.Е/А ПЦР» наконечником на 1000 мкл с фильтром 15-20 раз. Пройдитесь наконечником по внутренним стенкам пробирки несколько раз для того, чтобы смыть ПЦР-смесь с них. Раствор должен стать полностью однородный.

Не на вортесе !!! ВАЖНО !!! Ферменты подвергаются механическим повреждениям !!!

7.3.4. Приготовьте «Микс РРСС.Е/А ПЦР».

Смешайте в отдельной пробирке:

- 15 × (N+1) мкл Микс РРСС.Е/А ПЦР

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «КО» и «СТ2».

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 13 (В двух повторностях – 26)

Можно разливать ПЦР-смесь прямо из пробирки «Микс РРСС.Е/А ПЦР»

7.3.5. Аккуратно пипетируя, добавьте во все промаркированные пробирки/луночки по 15 мкл приготовленной смеси «Микс РРСС.Е/А ПЦР» наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.3.6. Встряхните пробирки с препаратом РНК (можно на вортесе – 10-20 секунд) и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3 – 5 сек.

7.3.7. Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты РНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите по **10 мкл** полученного из образцов препарата РНК в соответствующие пробирки/лунки для исследуемых образцов (по 2 шт для каждого образца – в случае необходимости проведения исследования в двух повторностях) наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.3.8. Внесите по **10 мкл** кДНК Положительного Стандарта «PPСС.Е СТ2 кДНК» в пробирки/лунки наконечником на 20 мкл с фильтром.

Внесите по **10 мкл** кДНК Положительного Стандарта «PPСС.А СТ2 кДНК» в пробирки/лунки наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.3.9. Внесите по **10 мкл** Отрицательного Контроля (КО⁻) в пробирки/лунки наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.3.10. Центрифугируйте пробирки при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек при комнатной температуре (18–25 °С).

7.3.11. Установите все пробирки в блок/ротор амплификатора детектирующего или обычного (He Real-Time). Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

8. УСТАНОВКА И ПРОГРАММИРОВАНИЕ АМПЛИФИКАТОРОВ, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)

Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе RotorGene:

Поместить пробирки в ротор амплификатора Rotor-Gene (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

Программирование амплификатора:

Rotor-Gene 3000 – программа Rotor-Gene версии 6,

Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программа Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора **Rotor-Gene 3000** / для англоязычной версии программы **Rotor-Gene 6000 (Rotor-Gene Q)** / для русскоязычной версии программы **Rotor-Gene 6000**:

- ✓ Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
- ✓ Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- ✓ Нажать кнопку **Next/Далее**.
- ✓ Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл**. Для RotorGene 6000 должно быть отмечено окошко **15 µL oil layer volume/15 мкл объем масла/воска**.
- ✓ Нажать кнопку **Next/Далее**.
- ✓ В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- ✓ Задать следующие параметры эксперимента: Флуоресценцию измеряют при 55 °С на каналах **FAM/Green, HEX/Yellow**.
- ✓ Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
- ✓ В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Онп.уровня сигн**. В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Онп. Детектируемых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге**

детекции. Для обоих каналов установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

- ✓ Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
- ✓ В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

Таблица. 2. Температурный режим амплификации для приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q

№ стадии	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	95	15	00	1		Цикл
2	95	0	10	42		Цикл
	60	0	20		✓	
3	10		Хранение

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM/Green):

- ✓ Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- ✓ Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- ✓ В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек уклона**.
- ✓ В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.
- ✓ Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- ✓ В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.
- ✓ В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации специфического участка вирусного генома (канал HEX/Yellow):

- ✓ Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. HEX/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- ✓ Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- ✓ В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек уклона**.
- ✓ Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- ✓ В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.

- ✓ В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.1**.
- ✓ В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

8.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5, iCycler iQ и CFX96 (Bio-Rad, США)

Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе BioRad:

Поместить пробирки в ротор амплификатора BioRad (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

Программирование амплификатора:

iCycler iQ – программа,

iCycler iQ5 – программа,

CFX96 – программа BioRad CFX Manager.

Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе Bio-Rad:

- ✓ Для прибора iCycler iQ5 в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Задать объем реакции (**Sample Volume**) **25 мкл**, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**. В окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.
Перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- ✓ Для прибора iCycler iQ в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**, в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.
Выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (ASFV.tmo) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.
Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.
Перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume – 25 мкл**. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- ✓ Для прибора **CFX96** в стартовом окне открыть **Create New Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run**). В окне **Run Setup** выбрать **Protocol** и нажать **Create New ...** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл**. В окне **Plate** модуля

Experiment Setup задать схему расположения планшета (пробирок), а также выставить нужные для эксперимента каналы для флуорофоров. Если набор выявляет один микроорганизм, то в меню **Sample Type** и выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores ...**, затем указать галочками флуорофоры **FAM** и **HEX** и нажать **OK**. После этого, галочками задать измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample Name** задать название образцов. Сохранить. Открыть крышку прибора, нажав **Open Lid** и поставить пробирки в соответствующие ячейки, закрыть крышку **Close Lid**. Запустить прибор **Start Run**.

Таблица. 3. Температурный режим амплификации для амплификаторов iCycler iQ5, iCycler iQ и CFX96

№ стадии	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	95	15	00	1		Цикл
2	95	0	10	42		Цикл
	60	0	20		✓	
3	10		Хранение

Анализ результатов амплификации специфического участка вирусного генома (канал Hex):

Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:

- ✓ Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results (iCycler iQ5)**. Дальнейший учет результатов проводят, используя полученные значения **Ct**.
- ✓ Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **PCR Quant (iCycler iQ)**. Дальнейший учет результатов проводят, используя полученные значения **Ct**.
- ✓ Для прибора **CFX96** в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** выбрать данные по каналу **HEX**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Чтобы установить уровень пороговой линии, необходимо либо перетащить ее с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать меню **Baseline Threshold** (в ниспадающем меню, вызываемом щелчком правой кнопки мыши по окну графиков флуоресценции), затем выбрать опцию **User Defined** и внести нужное значение в текстовое поле. Анализ результатов амплификации **ВКО**, регистрируемых по каналу **FAM** проводится аналогичным образом.

ПРИМЕЧАНИЕ: Анализ результатов проводится по каналам **FAM** и **HEX**. Результаты обрабатывают для каждого канала по-отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора. В режиме анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию) поочередно для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне **10-20%** от максимального уровня флуоресценции на последних циклах амплификации. При этом пороговая линия должна пересекать только **S**-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Эффективность амплификации должна составлять 90–130%.

- Результаты реакции для отрицательного контрольного образца и положительного стандарта должны соответствовать представленным в таблице 4.

Отрицательный контроль – не определяется.

Геном свиньи в качестве Внутреннего Контроля амплификации детектируются по каналу FAM.

Геном вируса РРСС, а также Положительные Контрольные Образцы СТ2 детектируются по каналу HEX и Cy5:

«РРСС.Е СТ2 κДНК» — ($5 \times 10^8 - 1 \times 10^8$ копий/мл).

«РРСС.А СТ2 κДНК» — ($5 \times 10^7 - 1 \times 10^7$ копий/мл).

Таблица. 4. Интерпретация результатов контрольных образцов

Стандарты	Значение Ct по каналу FAM	Значение Ct по каналу HEX	Значение Ct по каналу Cy5
Отрицательный Контроль	Не определяется	Не определяется	Не определяется
РРСС.Е СТ2 κДНК	Не определяется	19 — 21	Не определяется
РРСС.А СТ2 κДНК	Не определяется	Не определяется	22 — 24

ВНИМАНИЕ: Значения Ct для обоих стандартов могут отличаться от партии к партии !!!

- Интерпретация результатов амплификации испытуемых образцов может проводиться в двух режимах: качественном и количественном. Оценку результатов в качественном формате проводят в соответствии с **Таблицей 5** на странице номер 11.

Таблица. 5. Интерпретация результатов в качественном формате

Ct по каналу FAM \ Ct по каналу HEX	Ct < СТ2	СТ2 < Ct < Ct = 35	Ct = 35 < Ct < Ct = 37	Ct > Ct = 37
	Результат Положительный	Результат Положительный	Результат Сомнительный	Результат Отрицательный

Ct < 34	ДНК вируса обнаружена	ДНК вируса обнаружена	1. Может свидетельствовать о присутствии вялотекущей инфекции, или же о возможно недавно перенесенном заболевании 2. Может свидетельствовать о наличии вакцинного штамма в пробе	ДНК вируса не обнаружена
Выделение образца прошло успешно	Вирусных частиц более 10 ⁷ копий/мл. Заражение очень сильное.	Вирусных частиц менее 10 ⁷ копий/мл. Заражение сильное/среднее		Проба считается отрицательной
Ct > 34	Ct > Ct = 35, то Не прошло выделение образца или же использовался образец с деградировавшим материалом			

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.
- Комплект реагентов для ПЦР-амплификации, стандарты и отрицательный контроль следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение стандартов и отрицательного контроля при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности набора. Допускается многократное замораживание-оттаивание «Микс ПЦР» не более 5-7 раз.
- Транспортировку набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- Допускается кратковременное хранение при 2-10 °С не более 10-15 суток.
- Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.
- Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

11. СЛУЖБА ТЕХНИЧЕСКОЙ ПОДДЕРЖКИ

В случае появления вопросов обращайтесь в службу технической поддержки: dvleman@gmail.com, а также по телефону: +7 977 516 86 53.