

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ГРИППА А (Грипп А) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (РВ-ОТ/ПЦР)

РВ-ОТ/ПЦР-ГриппА (полный комплект на 50 реакций)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор – «РВ-ОТ/ПЦР-ГриппА» – предназначен для количественного определения РНК вируса Гриппа А в образцах сыворотке/цельной крови, в продуктах питания различного происхождения, а также в образцах патологического материала методом последовательной амплификации синтезированных фрагментов кДНК вируса Гриппа А с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов «РВ-ОТ/ПЦР-ГриппА» 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-Tag 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-ГриппА» состоит из следующих двух этапов: выделение РНК (пробоподготовка), Обратная Транскрипция и ПЦР-амплификация полученной кДНК Гриппа А в режиме реального времени.

В состав кДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой РНК, включена флуоресцентная метка **HEX**. В состав кДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации внутреннего контроля (геном свиньи или птицы), 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-ГриппА» включает образцы стандартов кДНК вируса Гриппа А в концентрациях:

ГриппА СТ2 кДНК: 5×10^8 - 1×10^8 копий/мл и дополнительно (по заказу) ГриппА СТ1 кДНК : 5×10^4 - 1×10^4 копий/мл

Таблица. 1. Каналы детекции продуктов амплификации.

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
ВКО	Грипп А	-	-	-

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

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

- **ГриппА СТ2** кДНК (5×10^8 - 1×10^8 копий/мл) – 1 пробирка (**100** мкл) – **красная** крышка;
- Отрицательный контроль (**КО**) – 1 пробирка (**100** мкл) – **зеленая** крышка.

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

- Смесь для амплификации «**Микс ГриппА Отр**» – 1 пробирка (**850** мкл) – **желтая** крышка;
- Смесь для амплификации «**Микс ГриппА 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 Гриппа А, определяется концентрация вируса в исследуемом материале. В образцах, не содержащих РНК вируса Гриппа А, 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 Гриппа А, определяемых детектирующим амплификатором, составляет 1×10^3 — 1×10^{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.

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-ГриппА» 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 **Гриппа А** готовы к постановки Обратной транскрипции и ПЦР-реакции.

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 ГриппА Отр» из комплекта реагентов.

7.2.3. Аккуратно пипетируя, перемешайте пробирку со смесью «Микс ГриппА 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 ГриппА Отр» и фермент «M-MLV ревертаза».

Смешайте в отдельной пробирке:

- 15 × (N+1) мкл Микс ГриппА 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 ГриппА 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/ротатор 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 Гриппа А 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 ГриппА ПЦР» из комплекта реагентов.

7.3.3. Аккуратно пипетируя, перемешайте пробирку со смесью «Микс ГриппА 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 ГриппА ПЦР».

Смешайте в отдельной пробирке:

- 15 × (N+1) мкл **Микс ГриппА 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 ГриппА ПЦР»

7.3.5. Аккуратно пипетируя, добавьте во все промаркированные пробирки/лунки по **15 мкл** приготовленной смеси «Микс ГриппА 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 «ГриппА 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/Опт.уровня сигн**. В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. 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 – 5Fl** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10Fl**. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

- ✓ Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. Дать название эксперименту 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
3	95	15	00	1		Цикл
4	95	0	10	42		Цикл
	60	0	20		✓	
5	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 **Сt**.

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 СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.1**.
- ✓ В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Сt**.

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, °C	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
3	95	15	00	1		Цикл
4	95	0	10	42		Цикл
	60	0	20		✓	
5	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 или птицы в качестве Внутреннего Контроля амплификации детектируются по каналу **FAM**.

Геном вируса Гриппа А, а также Положительный Контрольный Образец **СТ2** детектируется по каналу **HEX** :

«ГриппА СТ2 кДНК» — (5×10^8 - 1×10^8 копий/мл).

Таблица. 4. Интерпретация результатов контрольных образцов

Стандарты	Значение Ct по каналу FAM	Значение Ct по каналу HEX
Отрицательный Контроль	Не определяется	Не определяется
ГриппА СТ2 кДНК	Не определяется	19 — 21

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.

Опционально: для количественной оценки результатов в набор можно положить дополнительный положительный калибровочный образец:

«ГриппА СТ1 ДНК» — (5×10^4 - 1×10^4 копий/мл). Значения Ct для данного стандарта включены в прилагаемой расчетной табличке формата Excel.

Стандарты	Значение Ct по каналу FAM	Значение Ct по каналу HEX
ГриппА СТ1 кДНК	Не определяется	31 — 33

Таблица. 5. Интерпретация результатов в качественном формате

Ct по каналу HEX Ct по каналу FAM	Ct < CT2	CT2 < Ct < Ct = 35	Ct = 35 < Ct < Ct = 37	Ct > Ct = 37
	Результат Положительный	Результат Положительный	Результат Сомнительный	Результат Отрицательный
Ct < 34 Выделение образца прошло успешно	ДНК вируса обнаружена Вирусных частиц более 10 ⁷ копий/мл. Заражение очень сильное.	ДНК вируса обнаружена Вирусных частиц менее 10 ⁷ копий/мл. Заражение сильное/среднее	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 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: dvlaman@gmail.com, а также по телефону: +7 977 516 86 53.