

Методические рекомендации

по применению наборов реагентов серии «Интифика» с
использованием различных детектирующих
амплификаторов

Назначение

Данные методические рекомендации описывают порядок действий при использовании наборов реагентов серии «Интифика» с использованием следующих детектирующих амплификаторов:

- CFX96 (Bio-Rad, США)
- ДТпрайм/лайт (ДНК-Технология, Россия)
- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия)
- Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)
- LightCycler® 96 (Roche, Германия)

Список используемых сокращений

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ВКО	внутренний контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
К+	положительный контроль ПЦР
К-	отрицательный контроль экстракции
ПЦР-	отрицательный контроль ПЦР
ХХ	<i>Инфекционный агент</i> (например, Usp – <i>Ureaplasma species</i> , NG – <i>Neisseria gonorrhoeae</i>)
Сq	общее обозначение характеристической точки кривой флуоресценции (соответствует Ct, Cp)
СqХХ	граничные значения для Сq при амплификации ДНК инфекционного агента (канал амплификации ХХ); указываются во вкладыше к каждой серии набора

СqВК	граничные значения для Сq при амплификации ВКО (канал амплификации ВКО), указываются во вкладыше к каждой серии набора
СqПК	граничные значения для Сq при амплификации ПКО (канал амплификации ХХ), указываются во вкладыше к каждой серии набора
СqК-	значения для Сq при амплификации К- (канал амплификации ХХ) – определяется при наличии контаминации

Разделение рабочего пространства на зоны

Во избежание контаминации реакционных смесей ПЦР-ХХ и Таq ДНК-полимеразы, рекомендуется хранить используемые компоненты в тех рабочих зонах, где проводятся непосредственные операции с их применением:

Рабочая зона	Выполняемые операции	Компоненты
«Чистая»	<ul style="list-style-type: none"> Сборка готовых реакционных смесей ПЦР-смесь-ХХ + Таq Сборка отрицательного контроля ПЦР (ПЦР-ПЦР-смесь-ХХ + Таq + ОКО) 	ПЦР-смесь-ХХ Таq ОКО из наборов для детекции
«Грязная»	Выделение ДНК из исследуемых образцов, внесение ДНК в ПЦР пробирки	ВКО, ПКО-ХХ

Программа амплификации «Интифика»

Цикл	Температура, °С	Измерение флуоресценции	Время*	Число циклов
1	94	-	3 мин	1
2	94	-	10 с	5
	60	-	20 с	
3	94	-	10 с	45
	60	По указанным в пользовательской ИН флуорофорам	20 с	

* - для некоторых амплификаторов время может быть увеличено в связи с ограничением минимальной продолжительности стадии

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции

Флуорофор	Название каналов детекции сигнала на разных амплификаторах
FAM	FAM/Green
HEX	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3
ROX	ROX/Orange/Texas Red
Cy5	Cy5/Red
Cy5.5	Cy5.5/Crimson/Quasar705

Порядок действий при использовании амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США)

Запуск эксперимента

1) Включить прибор и запустить программу *Bio-Rad CFX Manager*.

2) На панели инструментов нажать кнопку **StartupWizard**, выбрать пункт создания нового эксперимента *Create a new Experiment*, либо выбрать предыдущий эксперимент *Repeat an Experiment* и нажать кнопку **OK**.

3) В окне постановки эксперимента *Experimental setup*, вкладка *Protocol* нажать кнопку **Edit Selected** для внесения изменений. Задать параметры амплификации в соответствии с программой амплификации «Интифика» и сохранить протокол под новым именем.

4) Во вкладке *Plate* окна *Experiment Setup* создать или загрузить существующую схему расположения образцов в термоблоке. Анализируемые образцы обозначить *Unknown*, «К-» – *Negative Control*, «К+» – *Positive Control*. Для всех образцов задать измерение флуоресценции по каналам, указанным в пользовательской инструкции к набору.

5) Поместить пробирки в амплификатор.

6) Перейти во вкладку запуска реакции *Start Run*. Закрыть крышку амплификатора, запустить реакцию, нажав кнопку **Start Run**, сохранить файл с экспериментом.

Обработка полученных данных

1) По завершении реакции появится окно *Data Analysis*, в котором отобразятся результаты обработки графиков флуоресцентных кривых. Файл данных также может быть

загружен путем нажатия кнопки Open a Data File на панели инструментов.

2) Выбрать режим определения значений пороговых циклов регрессионным анализом, нажав на панели инструментов *Settings*, из раскрывшегося меню выбрать *C(t)Determination Mode/Regression*. По завершении этих действий программа автоматически рассчитает значения пороговых циклов, при этом пороговая линия не будет отображаться.

3) Для анализа результатов можно выбрать как один, так и несколько каналов, при этом в нижней правой части окна программы отобразится таблица с результатами. При одновременном анализе нескольких каналов рекомендуется включить сортировку по флуорофору, нажав на заголовок столбца *Fluor*.

4) Перейти к этапу анализа результатов.

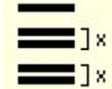
Порядок действий при использовании амплификатора ДТпраймлайт (ДНК-Технология, Россия)

Запуск эксперимента

1) Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR.

2) В стартовом окне программы нажать кнопку **Работа с прибором**.

3) Перейти во вкладку **Запуск программы амплификации**, нажать кнопку **Создать**, в появившемся окне **Шаблон программы амплификации** поставить галочку напротив пункта **Предварительный нагрев**, после чего

выбрать шаблон . В открывшемся окне **Редактор программ амплификации** ввести протокол амплификации в соответствии с программой амплификации «Интифика». Сохранить программу амплификации.

4) В строке меню нажать **Тест**, выбрать **Создать/Редактировать тест**, в открывшемся окне нажать кнопку **Создать новый тест**, ввести название нового теста и нажать кнопку **Ок**. В появившемся окне **Тест** изменить следующие параметры:

- «4. Контроли»: Задать количество контролей равное количеству наборов разного наименования, используемых за одну постановку.
- «5. Объем рабочей смеси в пробирке» - 30 мкл
- «6. Флуорофоры»: Для всех образцов задать измерение флуоресценции по каналам, указанным в пользовательской инструкции к набору. При этом «**Специфика**» соответствует каналу детекции ДНК инфекционного агента, а «**ВК**» – каналу детекции ВКО.

- «8. Программа амплификации»: выбрать созданную в предыдущем пункте программу амплификации.

5) Сохранить тест, нажав кнопку .

6) Во вкладке *Протокол* нажать кнопку , в открывшемся окне выбрать созданный тест, указать количество анализируемых образцов (без учета контролей). Добавить тест, нажав кнопку , при этом планшет заполнится автоматически.

7) Поместить пробирки в амплификатор.

8) Нажать кнопку . В открывшейся вкладке *Запуск программы амплификации* нажать кнопку . Затем перейти во вкладку «*Настройки*», выбрать пункт «*Диагностика прибора*», далее «*Измерить высоту пробирки*». После измерения высоты пробирок сохранить полученную величину для проведения последующих оптических измерений, выбрав кнопку в открывшемся диалоговом окне. Далее нажать кнопки и .

Обработка полученных данных

1) Анализ результатов проводится во вкладке «*Анализ оптических измерений*».

2) В пункте «*Тип анализа*» выбрать «*St(Cp) для всех каналов*». В пункте «*Метод*» выбрать «*Геометрический (Cp)*».

3) Программа автоматически рассчитает значения пороговых циклов.

4) Перейти к этапу анализа результатов.

Порядок действий при использовании амплификаторов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)

Запуск эксперимента

- 1) Включить прибор, запустить соответствующую программу.
- 2) Поместить пробирки в ротор амплификатора так, чтобы ротор был уравновешен, а первая пробирка была установлена в лунку 1.
- 3) Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
- 4) В открывшемся окне перейти во вкладку *Advanced/Детальный мастер* и выделить *Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)*. Нажать кнопку **New/Новый**.
- 5) В окне мастера создания протокола выбрать 36-well Rotor/36-луночный ротор и поставить галочку напротив пункта *No Domned 0,2 ml Tubes/Locking Ring Attached/Кольцо закреплено*. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- 6) В открывшемся окне задать имя оператора и выбрать объем реакционной смеси *Reaction volume/Объем реакции* – 30 мкл. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- 7) В открывшемся окне ввести температурный профиль амплификации. Для этого нажать **Edit profile/Редактор профиля** и задать параметры в соответствии с программой амплификации «Интифика».
- 8) Задать измерение флуоресценции по каналам, соответствующим флуорофорам, указанным в пользовательской инструкции к набору.

9) В окне *New Run Wizard/Мастер Нового Теста* нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimization.../Опт.уровня сигн.**

- задать калибровку по каналам соответствующим флуорофорам, указанным в пользовательской инструкции к набору. Для этого нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых;**

- задать калибровку перед первым измерением (*Perform Calibration Before 1st Acquisition/ Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции*).

10) Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. Сохранить файл с экспериментом.

11) После запуска амплификации программа автоматически выводит окно мастера редактирования расположения пробирок в роторе. Задать расположение пробирок и их тип.

Обработка полученных данных

1) По завершении реакции в меню нажать кнопку **Analysis/Анализ**, во вкладке *Quantitation* выделить надпись *Cycling A. FAM/Green* и нажать кнопку **Show/Показать**.

2) Отменить автоматическое определение пороговой линии *Threshold/Порог*.

3) Установить пороговое значение флуоресценции *Threshold/Порог = 0,03*.

4) В меню основного окна нажать кнопки **Slope Correct/Коррек.уклона**, **Dynamic Tube/Динамич. фон**.

5) Нажать кнопку **Outlier Removal/Устранение выбросов** и установить значение *NTC Threshold/Порог Фона - ПФ(NTC)* равным 5%.

6) Если в окне с графиком не отображаются все кнопки с настройками, указанные в п. 4 и п. 5) можно расширить окно или раскрыть их, нажав кнопку со стрелками >>, расположенную в правом верхнем углу окна с графиком.

7) Программа автоматически рассчитывает значения пороговых циклов (Ct) для реакции амплификации по каналу FAM.

8) Провести расчет для остальных каналов аналогично FAM.

9) Перейти к этапу анализа результатов.

Порядок действий при использовании амплификатора LC96 (Roche, Германия) Запуск эксперимента

1. Включить прибор и запустить программу *LightCycler® 96*.

2. Создать новый эксперимент, выполнив одно из действий:

- В навигаторе запуска выбрать Create New Experiment, либо выбрать предыдущий эксперимент в качестве матрицы *Create New Experiment from Existing*.

- В панели меню инструментов кликнуть по значку *INew Experiment* 

3. Рабочая программа *LightCycler® 96* откроет новый эксперимент в основном окне.

4. Ввести протокол амплификации, для этого необходимо

- в окне Programs нажать  и выбрать последовательно все необходимые элементы протокола с подтверждением выбора нажатием

кнопки *Add*, в столбце *Cycles* задать количество циклов.

- В окне *Measurement* задать объем реакции/*Reaction Volume* 30µl, нажав кнопку *Detection Format* задать измерение флуоресценции по каналам, указанным в пользовательской инструкции к набору, имеется 4 канала: *FAM*, *Hex*, *Texas Red* (эквивалент *ROX*) и *Cy5*.
 - Выбирая элементы протокола в окне *Steps* ввести продолжительность и температуру шагов в окне *Temperature* справа, а также задать съем флуоресценции в окне *Acquisition Mode*, выбрав *Single* для соответствующего шага.
5. Во вкладке *Sample Editor* создать существующую схему расположения образцов в термоблоке. Анализируемые образцы обозначить *Unknown*, «**K-**» – *Negative Control*, «**K+**» – *Positive Control*.
 6. Во вкладке *Sample Editor* в окне *Gene* для каждого из каналов ввести названия мишеней *XX* и для внутреннего контроля - *IC*.
 7. На панели инструментов нажать на значок *Save Experiment*  чтобы сохранить новый эксперимент, откроется диалоговое окно *Save As*. Выбрать директорию для сохранения файла эксперимента, присвоить имя, нажать *Save*, при этом эксперимент сохранится в виде файла с расширением *lc96*.
 8. Перенести файл эксперимента на прибор *LightCycler® 96* с помощью *USB* накопителя или через локальную сеть, нажав на панели *Tools/Instrument*

Manager и следуя указаниям руководства пользователя.

9. Поместить пробирки в амплификатор.

10. В меню прибора найти сохраненный эксперимент и запустить реакцию.

11. После завершения постановки первичные данные, полученные программой прибора, перенести в рабочую программу *LightCycler® 96* на компьютер с помощью USB накопителя или через локальную сеть, нажав на панели Tools/Instrument Manager и следуя указаниям руководства пользователя.

Обработка полученных данных

1. Запустить файл завершенного эксперимента и провести анализ, нажав
2. Перейти во вкладку Analysis, на панели инструментов нажать кнопку Add Analysis , в появившемся окне выбрать Qualitative detection и нажать ОК, в появившемся следом окне также нажать ОК.
3. Нажать кнопку Analysis Settings . В появившемся окне для всех мишеней и ВКО задать значение Minimal EPF = 0.100
4. В таблице с результатами Result Table отобразятся предварительные результаты качественного анализа.
5. Программа автоматически рассчитает значения пороговых циклов Cq.
6. Перейти к этапу анализа результатов.