

Методические рекомендации

по работе с наборами реагентов серии «Интифика»
для ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией на
различных детектирующих амплификаторах

Назначение

Методические рекомендации описывают основные принципы работы наборов реагентов серии «Интифика» для ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией и порядок работы с амплификаторами.

Амплификатор	Страница
CFX96 (Bio-Rad, США);	7
ДТпрайм/лайт (ДНК-Технология, Россия);	10
Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия); Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия);	15
LightCycler® 96 (Roche, Германия);	23
Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd, Сингапур).	26

Список используемых сокращений

ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ОТ-ПЦР	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ВКО	Внутренний контрольный образец
ПКО	Положительный контрольный образец
ОКО	Отрицательный контрольный образец
ВК	Внутренний контроль реакции
К+	Реакция с добавлением ПКО в качестве матрицы. Положительный контроль ПЦР
К-	Реакция с ОКО после экстракции НК. Отрицательный контроль экстракции
С _q (инф.АГ)	Пороговое значение С _q по соответствующему каналу флуоресценции при амплификации мишени инфекционного агента
С _q ВК	Пороговое значение С _q по каналу детекции флуоресценции внутреннего контроля реакции
С _q ПК	Пороговое значение С _q по каналу детекции флуоресценции для реакции К+ с положительным контрольным образцом

Примечание: *С_q(инф.АГ), С_qВК и С_qПК указываются во вкладыше к каждой серии набора.*

Разделение рабочего пространства на зоны

Во избежание контаминации реагентов из набора, рекомендуется хранить используемые компоненты в тех рабочих зонах, где проводятся непосредственные операции с их применением:

Рабочая зона	Выполняемые операции	Компоненты
«Чистая»	Сборка готовых реакционных смесей ПЦР-смесь + Taq+RT Сборка реакции отрицательного контроля ПЦР (К-) ПЦР-смесь + Taq+RT + ОКО	ПЦР-смесь Taq+RT ОКО
«Грязная»	Выделение ДНК/РНК из исследуемых образцов, внесение ДНК/РНК/ПКО в ПЦР пробирки	ВКО ПКО

Программа амплификации «Интифика» для ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией

Этап	Температура, °C	Измерение флуоресценции	Время*	Число циклов
1	50	-	15 мин (900 с)	1
2	94	-	3 мин (180 с)	1
3	94	-	10 с	5
	60	-	20 с	
4	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
R6G	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3/VIC
ROX	ROX/Orange/Texas Red
Cy5	Cy5/Red
Cy5.5	Cy5.5/Crimson/Quasar705

Анализ и интерпретация результатов

Оценка результатов проводится по каждому каналу детекции сигнала флуоресценции.

Для реакции К+ с ПКО определены и указаны во вкладыше к набору пороговые значения CqПК по соответствующим каналам детекции флуоресценции.

Для внутреннего контроля реакции определено и указано во вкладыше к набору пороговое значение CqВК по каналу детекции флуоресценции FAM.

Для специфических мишеней ДНК/РНК инфекционного агента определены и указаны во вкладыше к набору пороговые значения Cq (инф.АГ).

Оценка достоверности ПЦР-исследования

Вывод о достоверности ПЦР-исследования делается исходя из совокупности оценок амплификации по соответствующим каналам детекции флуоресценции в реакциях К+ и К-.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если для контрольных реакций:

- $CqK+ \leq CqПК$ по соответствующим каналам детекции флуоресценции;
- $CqK- > Cq$ (инф.АГ) по соответствующим каналам детекции флуоресценции или не определены.

Если хотя бы одно из условий не выполняется, то результаты ПЦР-исследования считаются недостоверными.

Допускается, что если **CqK+ > CqПК**, то можно учитывать положительные результаты, отрицательные результаты считаются недостоверными.

При выявлении контаминации необходимо предпринять меры по локализации и ликвидации её источника.

Для всех образцов в недостоверном ПЦР-исследовании необходимо повторить анализ, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.

Только в достоверном ПЦР-исследовании можно делать вывод о наличии или отсутствии копий ДНК/РНК инфекционного агента в образце.

Оценка результатов ПЦР-исследования

Вывод о наличии копий ДНК/РНК инфекционного агента в исследуемом образце делается исходя из совокупности количества положительных и отрицательных амплификаций в реакции по каждому каналу детекции флуоресценции.

Амплификация сигнала флуоресценции **внутреннего контроля** исследуемого образца по каналу FAM считается **положительной**, если выполнены следующие условия:

- **Cq Образца \leq CqВК** – по каналу FAM;
- График амплификации по каналу FAM имеет **S-образную форму**.

Амплификация **специфического сигнала** флуоресценции исследуемого образца по анализируемому каналу считается **положительной**, если выполнены следующие условия:

- **Cq Образца \leq Cq (инф. аг)** – по анализируемому каналу детекции флуоресценции;
- График амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции имеет **S-образную форму**.

Если хотя бы одно из условий не выполняется, то амплификация сигнала флуоресценции исследуемого образца по анализируемому каналу принимается как **отрицательная**.

Учет результатов в достоверном ПЦР-исследовании

Оценка по каналу FAM	Оценка по каналам специфических мишеней инфекционного агента ¹	Результат
+	+	Положительный
-	+	Положительный
+	-	Отрицательный
-	-	Недостоверный

«+» – положительная амплификация сигнала флуоресценции по анализируемому каналу, т.е. требования к форме графика амплификации и значению C_q выполняются.

«-» – отрицательная амплификация сигнала флуоресценции по анализируемому каналу, т.е. хотя бы одно условие положительной амплификации не выполняется.

Недостоверный результат ПЦР-исследования свидетельствует о недостаточном качестве образца выделенной НК. Для всех образцов с недостаточным результатом ПЦР-исследования необходимо повторить анализ, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.

В случае повторения недостаточного результата ПЦР-исследования рекомендуется принять меры по организации повторного забора материала².

¹ Количество положительных амплификаций, достаточных для принятия решения о наличии копий ДНК/РНК инфекционного агента в исследуемом образце зависит от количества специфических мишеней, определяемых набором реагентов и указано в инструкции.

² Забор материала проводить согласно Временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (Covid-19)», утвержденным Минздравом России 26.10.2020 (версия 9), Приложение 3-1.

Порядок действий при использовании амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США)³

Запуск ПЦР-исследования

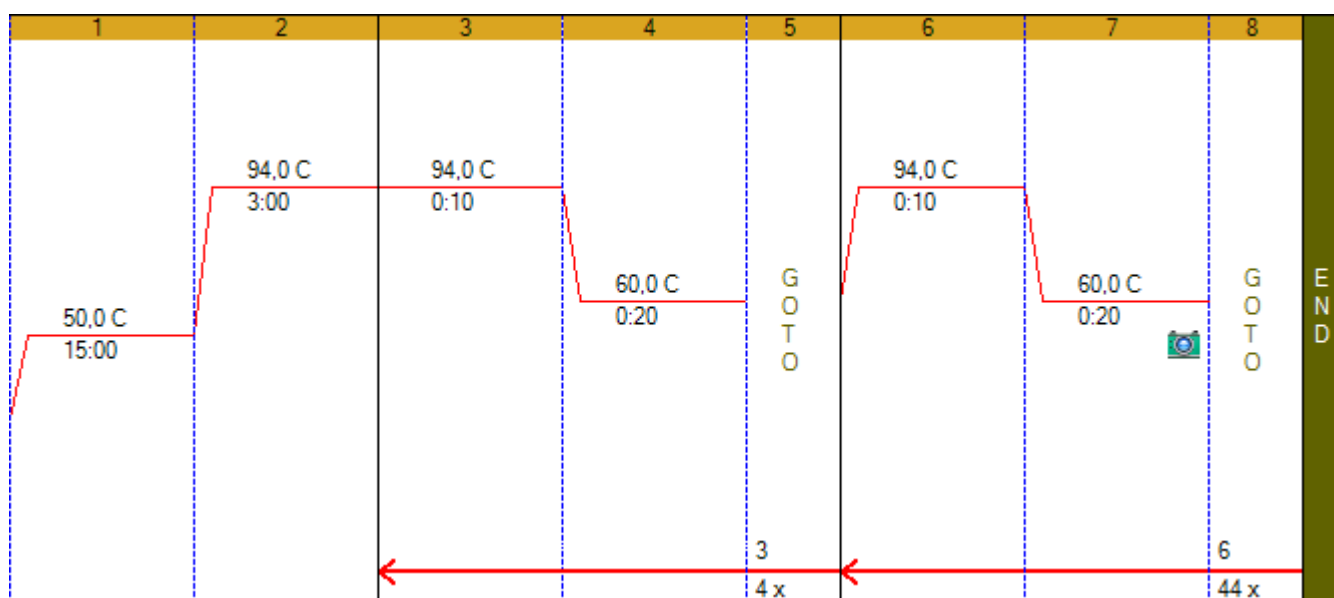
1) Включить прибор и запустить программу *Bio-Rad CFX Manager*.

2) Если окно *StartupWizard* не загрузилось автоматически, то на панели инструментов необходимо нажать кнопку



StartupWizard, выбрать пункт создания нового эксперимента **User-define**, либо выбрать предыдущий эксперимент во вкладке *Repeat an Experiment* и нажать кнопку **ОК**.

3) В окне постановки эксперимента *Run setup* во вкладке *Protocol* нажать кнопку **Edit Selected** для внесения изменений. Задать параметры амплификации в соответствии с программой амплификации «Интифика» для ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией и сохранить протокол под новым именем.



4) Во вкладке *Plate* окна *Run Setup* создать или загрузить существующую схему расположения образцов в термоблоке. Анализируемые образцы обозначить *Unknown*, «K-» – *Negative*

³ Версия Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Control, «K+» – *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*. Закрывать 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 находятся графики амплификации сигналов флуоресценции, схема расположения образцов в термоблоке и таблица результатов с описанием образцов и рассчитанными пороговыми циклами *Cq*. Файл данных также может быть



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

2) Открыть закладку *Quantification* и в меню *Settings* из выпадающего списка выбрать следующие параметры:

- *Cq Determination Mode = Regression*.

- *Baseline Settings = Baseline Subtracted Curve Fit*.

- *Cycles to Analyze*, и в открывшемся окне проставить *Analyse Data from Cycle 5 to 45*.

Программа автоматически рассчитывает значения пороговых циклов, и отобразит результаты в виде графиков амплификации и значений C_q в таблице.

3) Перейти к этапу анализа результатов согласно критериям оценки результатов исследования (стр. 4-6):

На схеме расположения образцов выбрать последовательно только К+ и К- для оценки достоверности ПЦР-исследования.

Оценка формы кривых проводится по графику кривых амплификации. При необходимости, для просмотра на графике необработанных данных, в меню *Settings* из выпадающего меню выбрать *Baseline Settings = No Baseline Subtraction*. При этом график изменится и в таблице с результатами исчезнут значения C_q .

- На схеме расположения образцов выбрать последовательно каждый образец для оценки результата по соответствующим каналам детекции флуоресценции.

5) Если для графиков амплификации S-образной формы значения C_q по методу регрессии не определяются, то рекомендуется переключиться на метод определения C_q по методу порога. Для этого в меню *Settings* выбрать из выпадающего списка следующие параметры: *Cq Determination Mode = Single Threshold*. При этом на графике появятся рассчитанные программой пороговые линии для всех кривых амплификации по каждому каналу флуоресцентной детекции.

Внимание! Чтобы избежать шумов на первых циклах необходимо короткое центрифугирование перед постановкой ПЦР-пробирок в амплификатор.

Порядок действий при использовании амплификатора ДТ-96 /ДТлайт (ДНК-Технология, Россия)

Запуск ПЦР-исследования

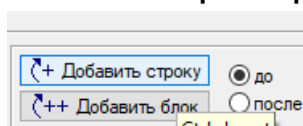
1) Включить прибор и запустить программу RealTime_PCR.
2) В стартовом окне программы нажать кнопку **Работа с прибором**.

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

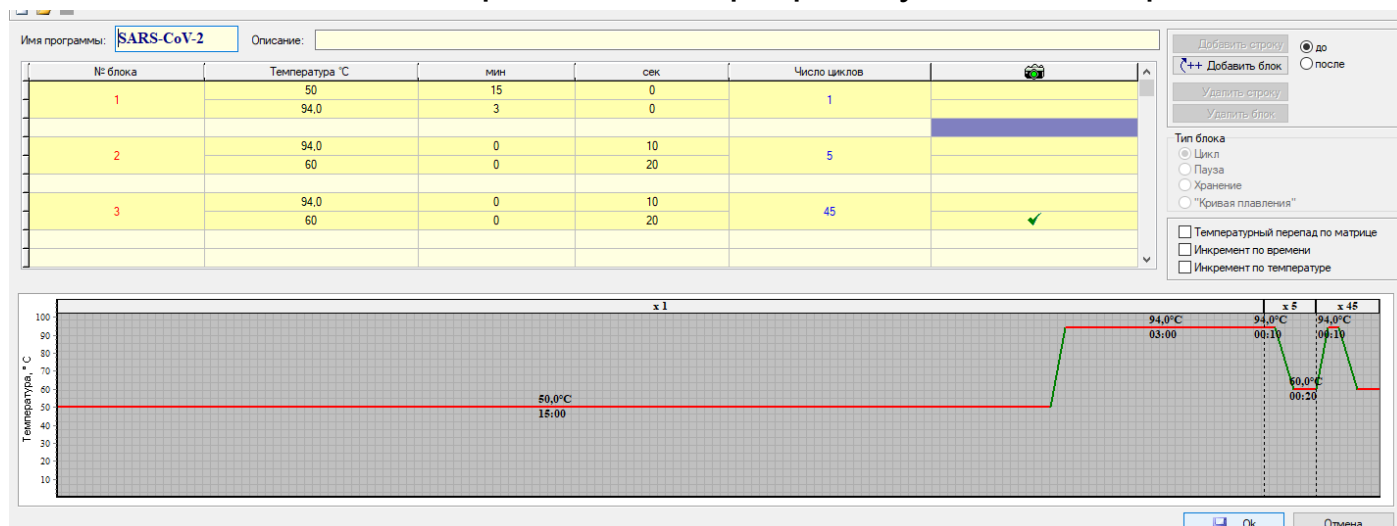


Предварительный нагрев, после чего выбрать шаблон

4) В открывшемся окне *Редактор программ амплификации* ввести протокол амплификации в соответствии с программой амплификации «Интифика». Для добавления строки этапа ревертирования необходимо добавить строку



Сохранить программу амплификации.



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

- «Тип»: Мультиплекс.

- «Пробирки»: сделать активными «образец», «контроль +», «контроль –».
- «Контроли»: Задать количество контролей равное количеству наборов разного наименования или разных серий, используемых за одну постановку.
- «Объем рабочей смеси в пробирке» - 25 мкл.
- «Флуорофоры»: Для всех образцов задать измерение флуоресценции по каналам, указанным в пользовательской инструкции к набору. При этом «*Специфика*» соответствует каналам детекции РНК инфекционного агента, а «*ВК*» – каналу детекции ВКО.
- «Программа амплификации»: выбрать созданную в предыдущем пункте программу амплификации.

Тест:

Описание:

Параметры:

1. Анализ: Тип: Метод:

2. Пробирки: ☒ образец ☒ контроль- ☐ стандарт ☒ контроль+

3. Стандарты: Количество: Дубли:

Раститровка

Стандарт	Значение
Стандарт_1	0
Стандарт_2	0
Стандарт_3	0
Стандарт_4	0

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

5. Объем рабочей смеси в пробирке: мкл

6. Флуорофоры: Fam Hex Rox Cy5 Cy5.5 ВК C C C C -

7. Параметры анализа полиморфизмов: Гетерозигота dCp < Гомозигота dCp >

8. Программа амплификации: SARS-CoV-2

1. 50.0 °C - 15:00 94.0 °C - 03:00] x 5
2. 94.0 °C - 00:10 60.0 °C - 00:20	
3. 94.0 °C - 00:10 60.0 °C - 00:20] x 45

Дополнительно

6) Сохранить тест, нажав кнопку **Ok**.

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

8) Поместить пробирки в амплификатор.

9) Нажать кнопку **Применить**.

10) На панели инструментов во вкладке «*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 и сохранить файл с экспериментом

11) Во вкладке *Запуск программы амплификации* нажать кнопку и

12) Указать путь для сохранения файла с результатами амплификации.

Внимание!

Информируем Вас, что оборудование имеет заводскую калибровку оптической системы. Применение нерезидентного программного обеспечения при работе с оборудованием может приводить к изменениям настроек экспозиции. В этом случае при работе с тест-системами производства Компании Алкор Био необходимо проверять соответствие настроек экспозиции заводским характеристикам.

В случае, если настройки экспозиции были изменены, перед запуском программы амплификации необходимо установить заводские настройки для каждого канала считывания флуоресценции, следуя пунктам 13 – 15.

13) На панели инструментов во вкладке «*Настройки*» выбрать «*Экспозиция измерений*».

14) В окне Экспозиция измерений установить заводские значения экспозиции для каждого канала флуоресценции.

15) Нажать кнопку .


Обработка полученных данных


1) Анализ результатов поводится во вкладке «*Анализ оптических измерений*». В окне отображены графики




амплификации флуоресцентных сигналов и таблица со списком образцов и результатами определения пороговых циклов.



2) Выбрать следующие параметры для анализа и отображения данных:


- В меню «Метод» из выпадающего списка выбрать *Геометрический (Cp)*. В таблице со списком образцов определенные пороговые циклы будут выражены в Cp.

- Кнопкой «Изменить параметры анализа»  вызвать окно «Параметры анализа» и установить:

- Критерий положительного результата ПЦР = 90 %;
- Величина Threshold 10 StD на участке линейного фитирования;
- Критерий достоверности результатов – не устанавливать;
- Нормализация данных – не устанавливать.
- Кнопка фитирование (сглаживание) данных  – включена.

- В меню «Выбор оптического канала»  Fam  из выпадающего списка выбрать все флуорофоры 

- Кнопкой  вызвать дополнительную инструментальную панель, и в параметре «Тип анализа»  из выпадающего списка выбрать *Мультиплекс*.

- Внизу под графиком кнопку автоматической настройки шкалы  выставить на On.

- Под таблицей в меню «Режим просмотра данных» из выпадающего списка выбрать:

«Показывать только выбранные пробирки» – отмечено.

«Режим FAM\HEX\ROX\Cy5» - «Показывать по одной пробирке» - отмечено.

3) Перейти к этапу анализа результатов согласно критериям оценки результатов исследования (стр. 4-6):

- Визуальная оценка формы графика амплификации флуоресцентного сигнала по каждому исследуемому каналу

проводится во вкладке «Анализ оптических измерений» для каждого образца отдельно.

- При необходимости, для просмотра на графике необработанных данных, в меню «Метод» из выпадающего списка выбрать *Исходные данные*. При этом график изменится и в таблице с результатами исчезнут значения Ср.

- В таблице со списком образцов и результатами определения Ср выбрать последовательно только К+ и К- для оценки достоверности ПЦР-исследования.

- В таблице со списком образцов и результатами определения Ср выбрать последовательно каждый образец для оценки результата по соответствующим каналам детекции флуоресценции.

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

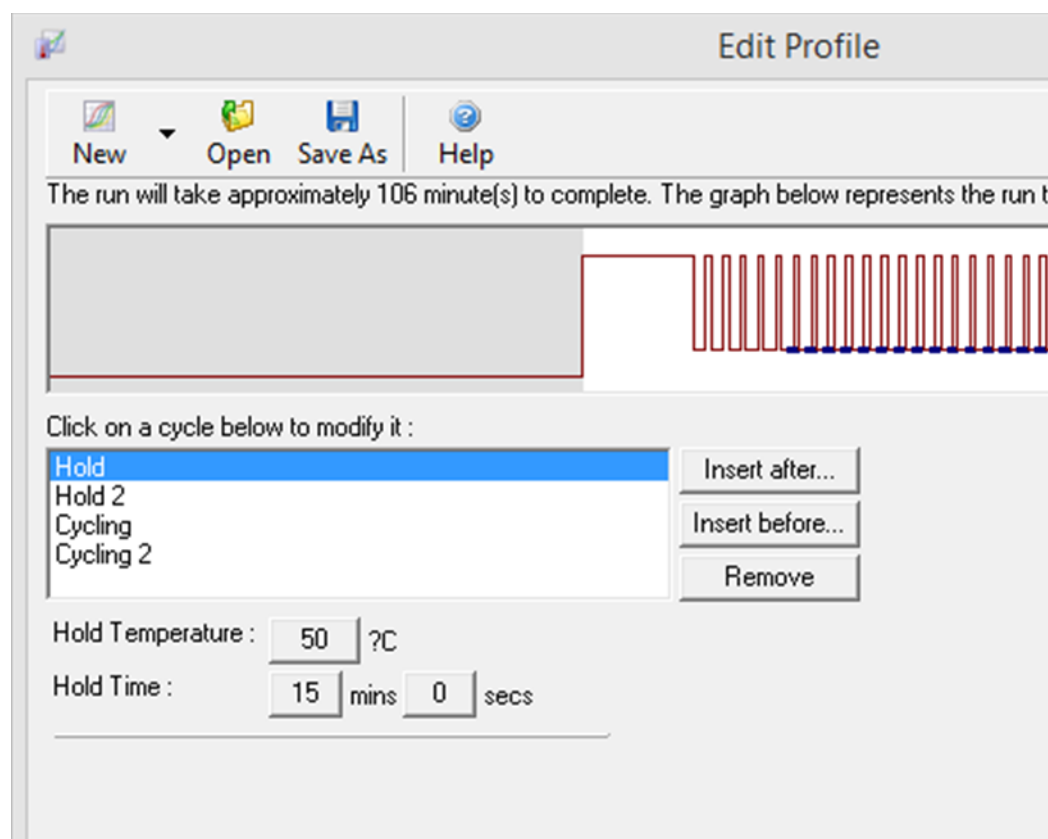
Запуск ПЦР-исследования

Для работы с приборами Rotor-Gene 6000/Q следует использовать программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7(build 67) или выше. Далее по тексту указаны названия вкладок, кнопок и команд для различных приборов и программного обеспечения в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 с программой Rotor-Gene версии 6 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

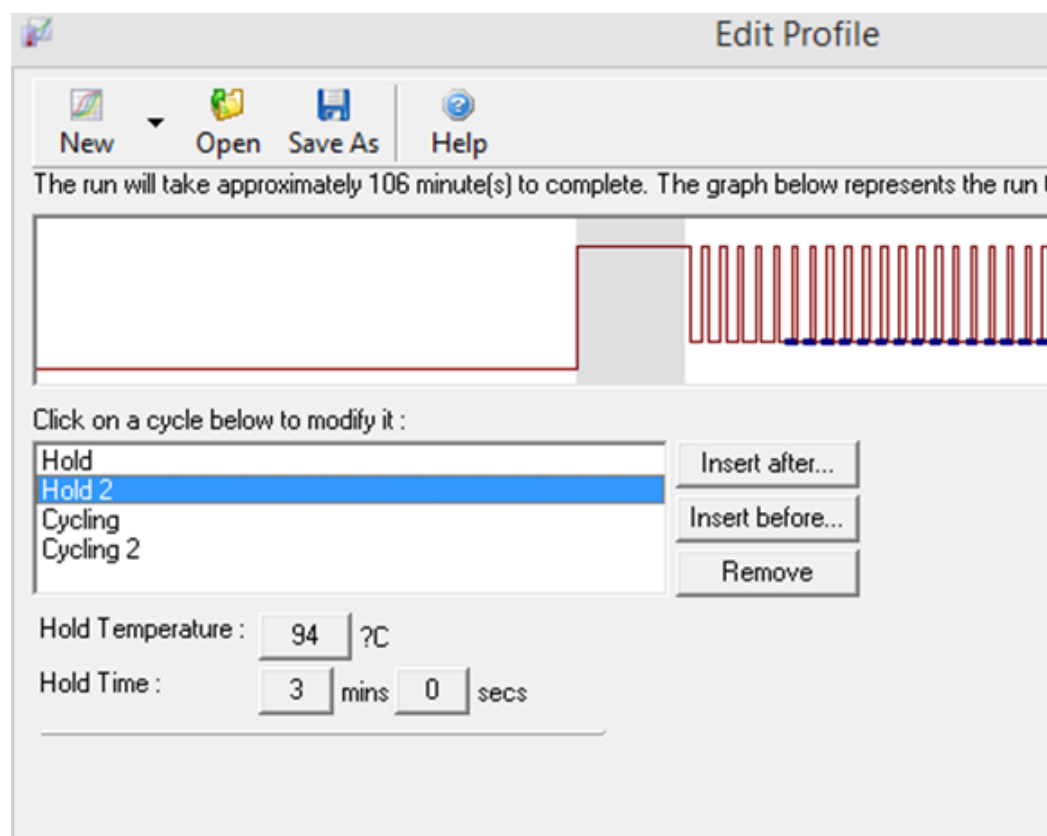
- 1) Включить прибор, запустить соответствующую программу.
- 2) Поместить пробирки в ротор амплификатора так, чтобы ротор был уравновешен, а первая пробирка была установлена в лунку 1.
- 3) Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
- 4) В открывшемся окне перейти во вкладку *Advanced/Детальный мастер* и выделить *Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)/Двухшаговый цикл*. 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* – 25 мкл. При необходимости поставить галочку напротив пункта *15 µl oil layer volume /15 мкл с добав. воска*. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- 7) В окне *New Run Wizard/Мастер Нового Теста* ввести температурный профиль амплификации. Для этого нажать **Edit**

profile/Редактор профиля] и задать параметры в соответствии с программой амплификации «Интифика RT-PCR».

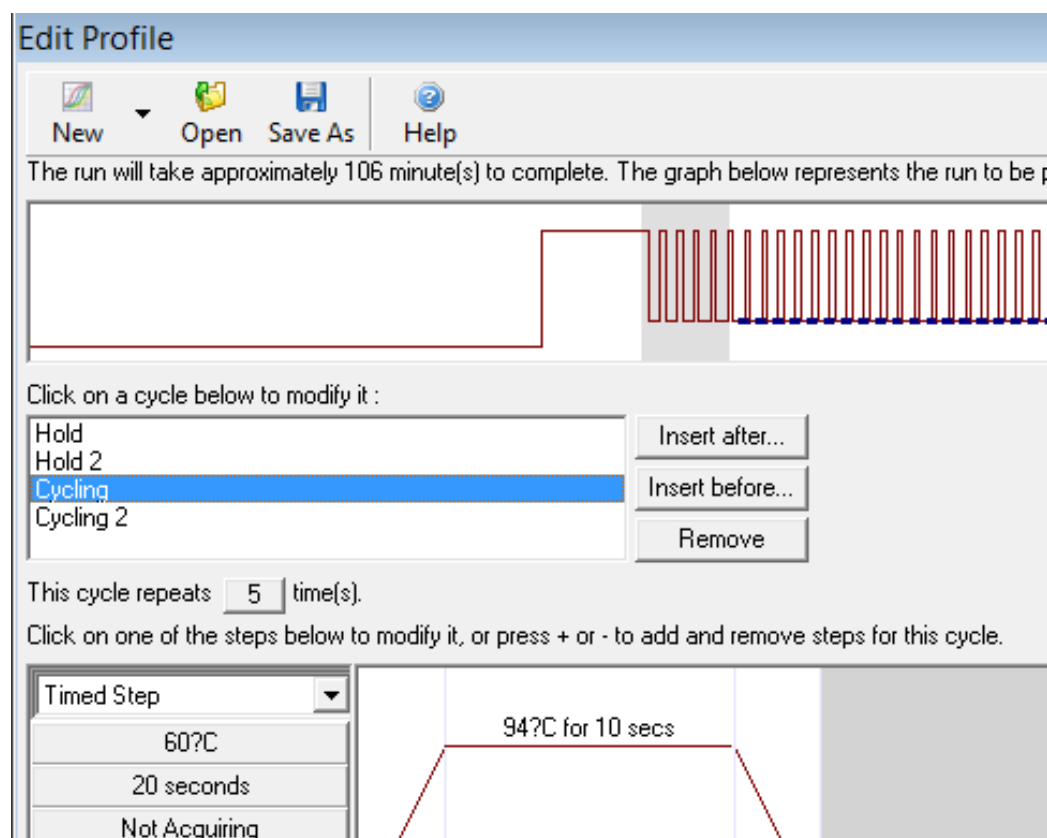
Этап «удержания температуры»:
50 градусов, 15 минут

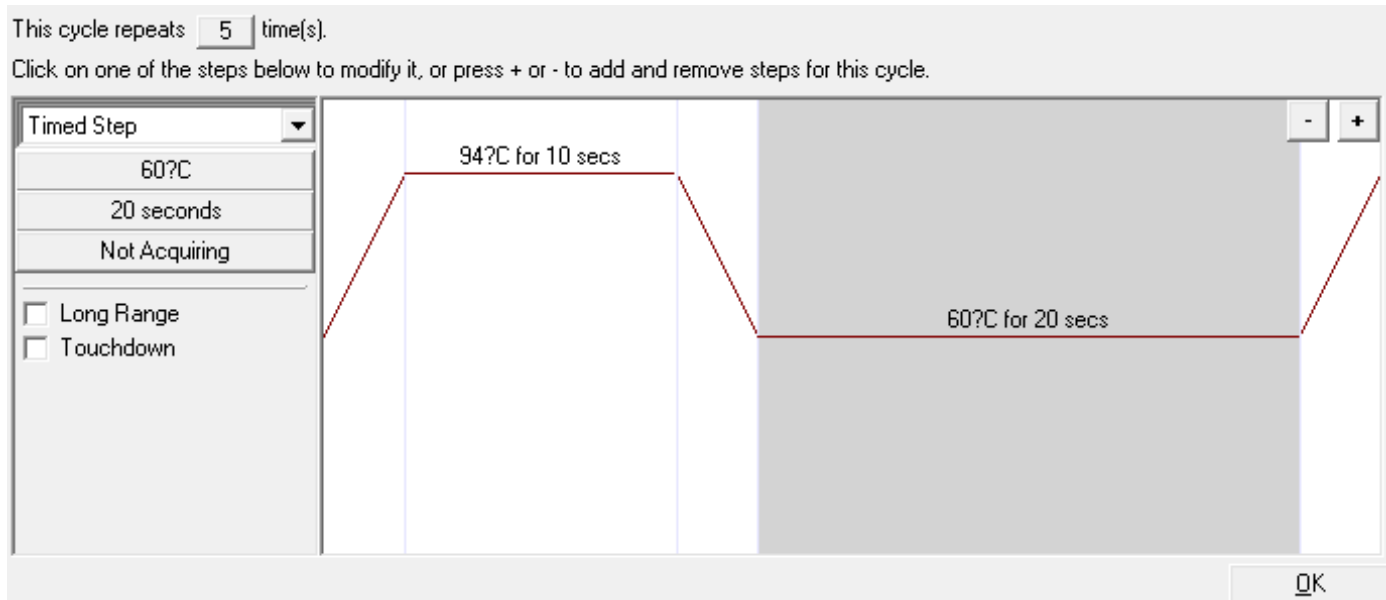


Этап «Удержание температуры 2»:
94 градуса, 3 минуты

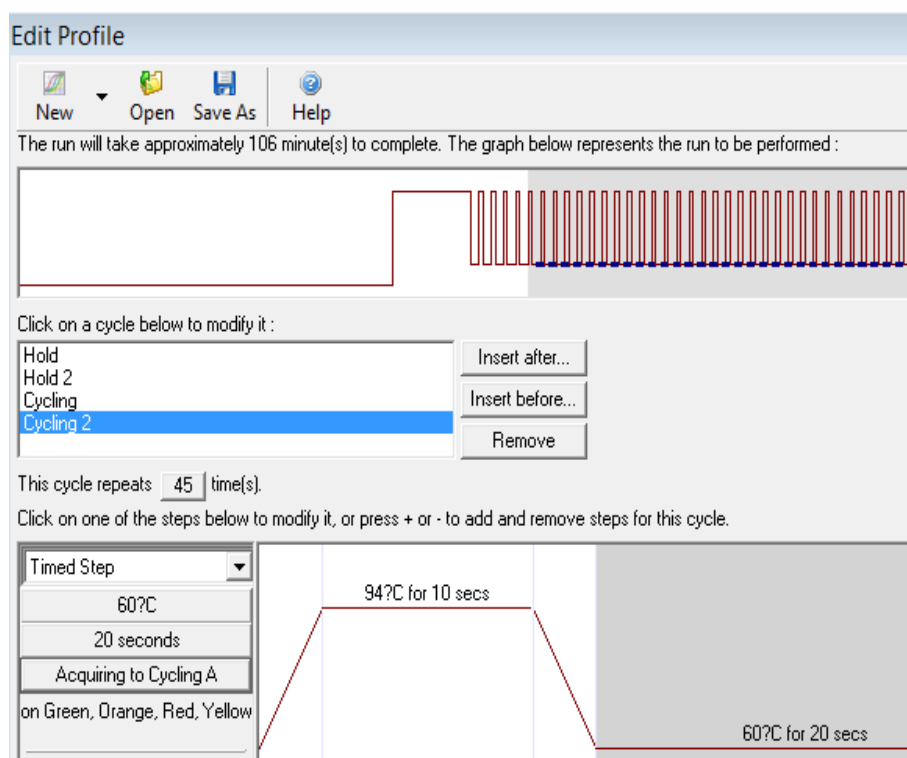


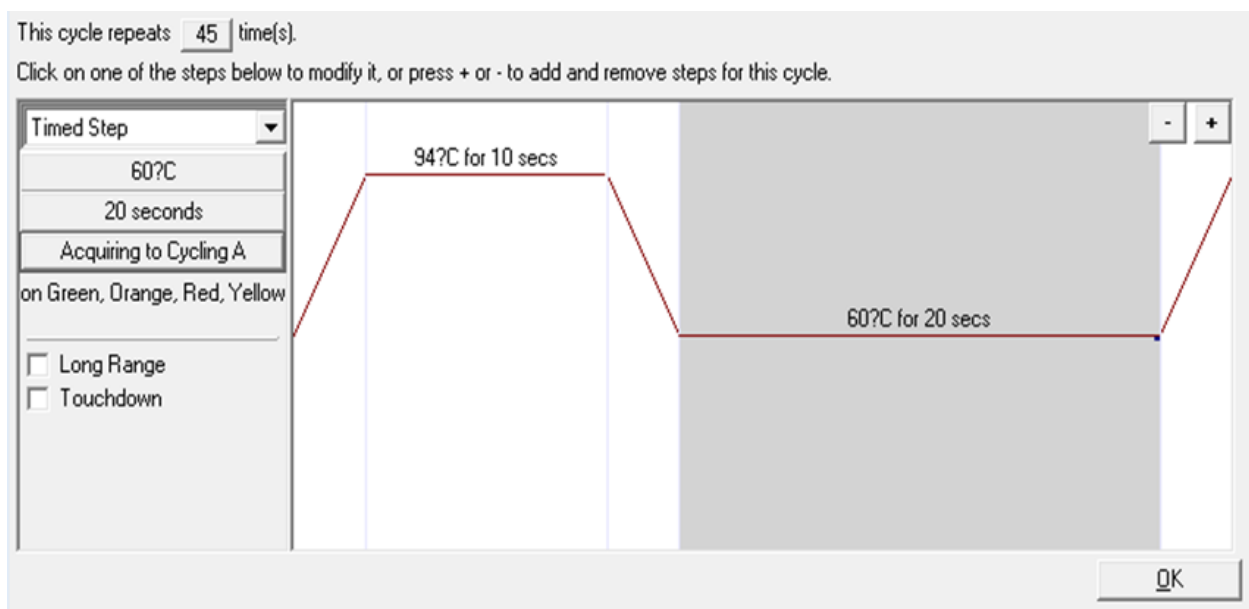
Этап «Циклирование»: 5 раз
94 градуса, 10 секунд
60 градусов, 20 секунд





Этап «Циклирование»: 45 раз
 94 градуса, 10 секунд
 60 градусов, 20 секунд





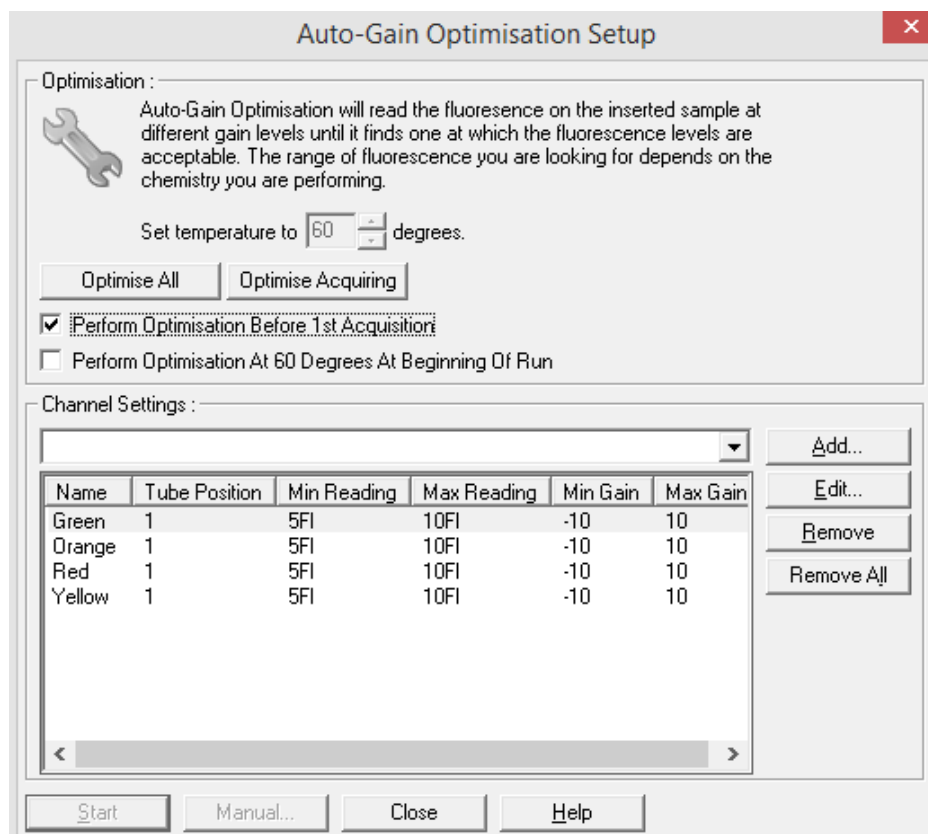
8) Задать измерение флуоресценции по каналам, соответствующим флуорофорам, указанным в пользовательской инструкции к набору. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.

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

- задать калибровку по каналам соответствующим флуорофорам в диапазоне от 5Fl до 10Fl. 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*).

Нажать кнопку **Clouse/Заккрыть**.



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) Открыть файл с данными амплификации, и на панели *View/Просмотр* нажать кнопку *Analysis/Анализ*.

2) В появившемся окне **Analysis/Анализ** выбрать закладку *Quantitation/Количественный*, из списка выбрать канал детекции флуоресценции и нажать **Show/Показать**.

3) На рабочем столе откроются три окна для выбранного канала детекции:

- *Quantitation analysis/Количественный Анализ* – показывает кривые амплификации для всех образцов и на верхней панели –

изменяемые параметры анализа. Если это окно активно, то в левой нижней части рабочего стола появляется панель *CT Calculation/Вычисление СТ*.

- *Quant. Results/Количественные Результаты* – таблица со списком образцов и результатами определения пороговых циклов Ct.

- *Standard Curve/График станд.* – для анализа не понадобится, необходимо закрыть.

При появлении окна *Calculate Automated Threshold/Вычислить порог автоматически* выбрать *Cancel/Отменить* и закрыть.

4) В окне *Quantitation analysis/Количественный анализ* отобразить кривые амплификации в режимах *Auto-Scale/Автошкала* и *Linear Scale/Линейная шкала*. На верхней панели выбрать параметры анализа:

- *Dynamic Tube/Динамич.фон* = включено

- *Slope Correct/Коррект.уклона* = включено

- *Ignore First/Игнор.первые* = в открывшемся окне *Ignore First/Игнор.первые* поставить 5 Cycles/Циклов

- *Take Off Adj.* = отключено

- *Outlier Removal/Устранение выбросов* = в открывшемся окне *Outlier Removal* в поле *NTC Threshold/Порог фона* поставить 15 %

5) В панели *CT Calculation/Вычисление СТ* поставить

- *Threshold/Порог* = 0,01 (Внимание – через запятую!)

- *Eliminate Cycles Before/Исключить циклы до* = 10

6) После введения всех параметров анализа программа автоматически проведет необходимые преобразования графика

кривых амплификации с выставлением линии порогового уровня (*Threshold/Порог*) и рассчитает пороговые циклы *Ct*.

7) Перейти к этапу анализа результатов согласно критериям оценки результатов исследования (стр. 4-6):

- Оценка формы кривых проводится по графику кривых амплификации. При необходимости, для просмотра на графике необработанных данных, в меню *Channels/Каналы* выбрать соответствующий канал амплификации. При этом откроется окно *Raw Channel/Исходные данные*.

- В таблице со списком образцов и результатами определения *Ct* выбрать последовательно только К+ и К- для оценки достоверности всего ПЦР исследования по форме кривых амплификации и пороговых циклов *Cq* по соответствующему каналу детекции флуоресценции.


- В таблице со списком образцов и результатами определения *Ct* выбрать последовательно каждый образец для определения результата по форме кривых амплификации и пороговых циклов *Cq* по соответствующим каналам детекции флуоресценции.

Порядок действий при использовании амплификатора LC96 (Roche, США)

Запуск ПЦР-исследования

- 1) Включить прибор и запустить программу LightCycler® 96.
- 2) Создать новый эксперимент, выполнив одно из действий:


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

- В панели меню инструментов кликнуть по значку  **New 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* **25 µl**.

- 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. Подтвердить выбор, нажав **OK**.

- 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.

6) Анализируемые образцы обозначить Unknown, «K-» – Negative Control, «K+» – Positive Control.

7) Во вкладке *Sample Editor* в окне *Gene* для каждого из каналов ввести названия мишеней Инф.аг. и для внутреннего контроля - *IC*.



8) 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*.

9) 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.

10) Поместить пробирки в амплификатор.

11) В меню прибора найти сохраненный эксперимент и запустить реакцию.

12) 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.

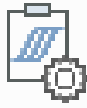
Обработка полученных данных

1) Запустить файл завершенного эксперимента и провести анализ.

2) Перейти во вкладку *Analysis*, на панели инструментов



нажать кнопку *Add Analysis*, в появившемся окне выбрать *Qualitative detection* и нажать **OK**, в появившемся следом окне, выбрав *Internal Control Dye: FAM*, также нажать **OK**.



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 C_q .


6) Перейти к этапу анализа результатов (стр. 4-6).

7) Для анализа результатов можно выбрать как один, так и несколько каналов, для удобства воспользуйтесь функциями сортировки.

8) Для получения надёжных результатов важно соблюдение инструкции, в том числе выполнить короткое центрифугирование перед постановкой ПЦР-пробирок в амплификатор.

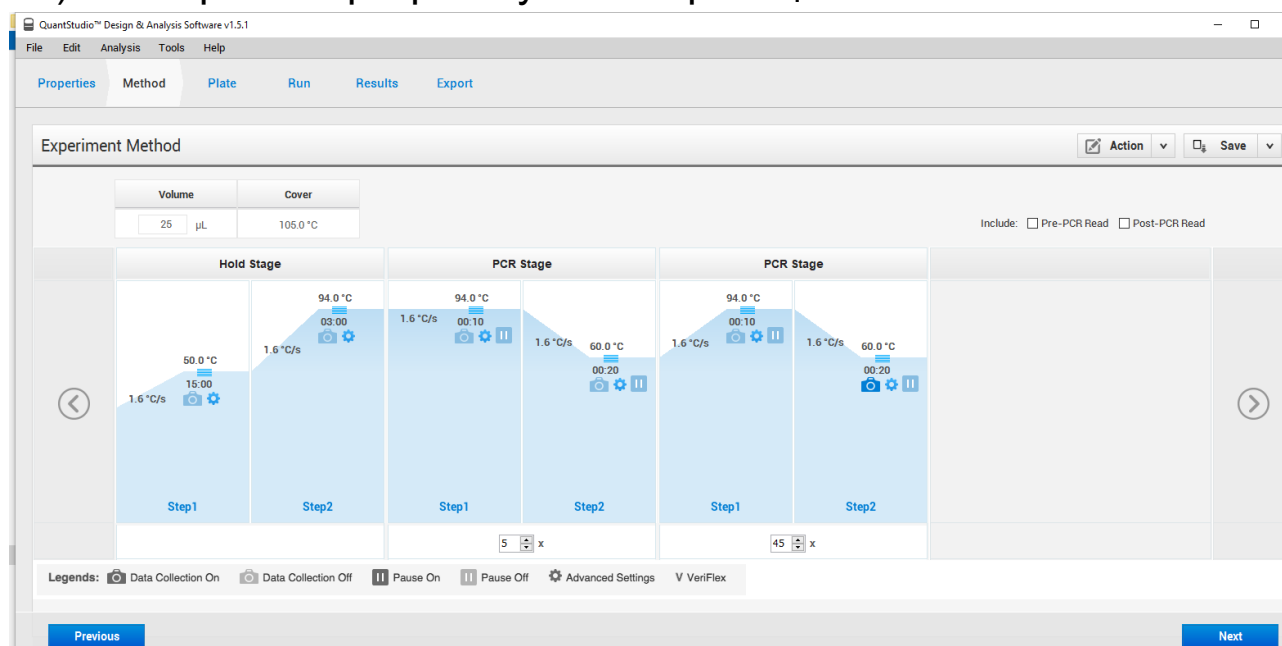
Порядок действий при использовании амплификатора Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd, Сингапур)

Запуск ПЦР-исследования





- 1) Включить прибор и запустить программу QuantStudio™ Design & Analysis Software.
- 2) Нажать кнопку **Create New Experiment** 
- 3) При необходимости заполнить поля Name, Barcode, User name, Comments
- 4) В поле Instrument type выбрать QuantStudio™ 5 System
- 5) В поле Block type выбрать тип установленного в приборе нагревательного блока.

*Набор реагентов Интифика апробирован на инструменте с установленным типом блока **96-Well 0.2-mL Block***



- 6) В поле Experiment type выбрать Custom
- 7) В поле Chemistry выбрать TaqMan® Reagents
- 8) В поле Run mode выбрать Standart
- 9) Нажать кнопку **Next**.
- 10) В поле Volume установить значение 25 µL
- 11) Настроить программу амплификации



- 12) Нажать кнопку Next.
- 13) В окне Assing Target and Samples выбрать вкладку Advanced Setup
- 14) В поле Targets нажать кнопку Add. Добавить четыре строки.
- 15) Настроить поле Targets в соответствии с Рисунком:

Targets								
		Name	Reporter	Quencher	Comments	Task	Quantity	
<input type="checkbox"/>		RdRp	ROX	NFQ-MGB		▼		✕
<input type="checkbox"/>		BK	FAM	NFQ-MGB		▼		✕
<input type="checkbox"/>		ORF8	VIC	NFQ-MGB		▼		✕
<input type="checkbox"/>		N	CY5	NFQ-MGB		▼		✕

Цвет, выбранный для Target (мишени), будет использован программой при отображении графиков амплификации. Рекомендуем выбирать разные цвета.

- 16) В поле Samples нажать кнопку Add. Добавить количество строк, соответствующее количеству анализируемых образцов.
- 17) В столбце Samples Name поля Samples ввести номера образцов.
- 18) Если необходимо, в столбце Comments поля Samples ввести необходимую информацию об образцах.
- 19) На панели инструментов для настройки плашки нажать кнопку  выбрать отображение в виде планшета.
- 20) На схеме планшета выбрать лунку. Для этого кликнуть на выбранную лунку курсором мыши.
- 21) В поле Targets выбрать все четыре мишени.
- 22) В столбце Task поля Targets для каждой мишени выбрать тип  - Unknown.
- 23) В поле Samples выбрать один из анализируемых образцов.

Для выбранной лунки установлены параметры считывания флуоресценции по каналам ROX, FAM, VIC и Cy5, указан анализируемый образец.

24) Повторить пункты 20 – 22 для каждого анализируемого образца, каждый раз меняя расположение лунок.

25) Нажать кнопку .

26) В окне Run Control нажать кнопку .

27) Указать путь для сохранения результатов амплификации.

Обработка полученных данных

1) Запустить файл завершенного эксперимента.

2) В окне Results в правой части отображены графики амплификации, в левой части отображены результаты определения Ct для каждого образца и канала считывания.

3) На панели инструментов настройки результатов в раскрывающемся списке мишеней выбрать RdRp.

4) Нажать кнопку . Из раскрывающегося списка Plot Type выбрать ΔR vs Cycle.


5) Из раскрывающегося списка Graf type выбрать Linear.

6) Из раскрывающегося списка Plot Color выбрать Target.

7) В поле Threshold снять отметку Auto и установить значение 5000.

8) Установить отметку Auto Baseline.

9) Повторить пункты 3 – 8 для каждого типа мишени.

10) На панели инструментов настройки вида отображения результатов определения Ct нажать кнопку .

11) Из раскрывающегося списка Group by выбрать Sample Name.

12) В раскрывающемся списке View установить отметки для Sample Name, Target Name, Dyes, Ct, Amp Status.

13) Программа автоматически рассчитывает значения пороговых циклов Ct.

14) Программа автоматически оценивает форму графика и достоверность амплификации и определяет статус амплификации по каждому каналу.

15) Перейти к этапу анализа результатов (стр. 4-6).

Критерий оценки формы графика амплификации заменить на оценку статуса амплификации по каждому каналу:

- Отметка Amp в столбце Amp Status соответствует оценке S-образной формы графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции.
- Отметка No Amp в столбце Amp Status соответствует оценке неправильной, линейной форме графика амплификации по анализируемому каналу детекции флуоресценции. Амплификация с обозначением No Amp должна учитываться как отрицательная по анализируемому каналу детекции флуоресценции.

Учет результатов достоверного ПЦР-исследования на примере набора реагентов Интифика SARS-CoV-2

Оценка по каналу FAM	Оценка по каналу ROX	Оценка по каналу HEX	Оценка по каналу Cy5	Результат
+	+	+	+	Положительный
+	-	+	+	Положительный
+	+	-	+	Положительный
+	+	+	-	Положительный
+	+	-	-	Отрицательный
+	-	+	-	Отрицательный
+	-	-	+	Отрицательный
+	-	-	-	Отрицательный
-	+	-	-	Недостоверный
-	-	+	-	Недостоверный
-	-	-	+	Недостоверный
-	-	-	-	Недостоверный

«+» – положительная амплификация сигнала флуоресценции по анализируемому каналу, т.е. требования к форме графика амплификации и значению C_q выполняются.

«-» – отрицательная амплификация сигнала флуоресценции по анализируемому каналу, т.е. хотя бы одно условие положительной амплификации не выполняется.

Наличие двух положительных амплификаций специфических мишеней из трёх свидетельствует о присутствии копий вируса SARS-CoV-2 в исследуемом образце.