

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

В.В. Малеев

«25» июля 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «АДЕНОВИР» для выявления и дифференциации аденовируса плотоядных методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «АДЕНОВИР» предназначена для выявления и дифференциации ДНК аденовируса плотоядных первого типа (*Canine adenovirus 1*), вызывающего гепатит плотоядных, и аденовируса плотоядных второго типа (*Canine adenovirus 2*), вызывающего аденовироз собак, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Для формы комплектации с электрофоретической детекцией метод выявления ДНК аденовирусов плотоядных основан на экстракции ДНК из биологического материала, проведении амплификации полученной ДНК и электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле.

Для формы комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», метод выявления ДНК аденовирусов плотоядных основан на экстракции ДНК из биологического материала, совместно с ДНК **экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО)**, проведении амплификации полученной ДНК и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов

амплификации в режиме «реального времени». Результат амплификации ДНК аденовируса первого типа регистрируется по каналу для флуорофора **FAM**, результат амплификации ДНК аденовируса второго типа регистрируется по каналу для флуорофора **JOE**, результат амплификации экзогенного ВКО регистрируется по каналу для флуорофора **ROX**. Использование **экзогенного ВКО** позволяет контролировать основные этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и проведение амплификации ДНК).

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК аденовируса плотоядных. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, электрофоретической детекции, рекомендованные Изготовителем.

Форма 2 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Формы 1, 2 рассчитаны на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5 – комплект реагентов для амплификации участка ДНК аденовируса плотоядных – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-R CAV 1/2, раскапана под воск	0,005	55 пробирок объемом 0,5 мл
ПЦР-смесь-2 blue	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК CAV тип 1	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК CAV тип 2	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

Форма 1: **REF** VET-30-R0,5-K; **REF** V-3331-4-5; Форма 2: **REF** VET-30-FRT(RG,IQ)-K; **REF** V-3332-1 /

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,6	2 пробирки

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участка ДНК аденовируса плотоядных с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT CAV ½	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Flu	0,42	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК CAV1 / CAV2 / ВКО	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,6	2 пробирки
ВКО-FL	1,0	1 пробирка

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

Реагенты «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

– Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.

ВНИМАНИЕ! Запрещается перемещение персонала из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, выдерживаются в растворе

¹ Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплекты реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп».
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для

экстракции ДНК.

Амплификация

3. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
7. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
8. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
9. Программируемый амплификатор для пробирок объемом 0,5 мл (например, «Терцик», ООО «НПО «ДНК-Технология», Россия), или другие, рекомендованные Изготовителем - при работе с формой комплектации с электрофоретической детекцией.
10. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000

(Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ/ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)) или другие, рекомендованные Изготовителем - при работе с формой комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. Емкость для сброса наконечников.

Электрофоретическая детекция продуктов амплификации

14. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ».
15. Дополнительные материалы и оборудование для электрофоретической детекции продуктов амплификации – согласно инструкции к комплекту реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат: мазки с конъюнктивы, мазки из носа, фекалии (при наличии расстройства ЖКТ) и сыворотка крови (при подозрении на гепатит собак).

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

Мазки с конъюнктивы берут стерильными зондами с ватными тампонами, смоченными в физиологическом растворе. После взятия материала рабочую часть зонда с ватным тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 300 мкл стерильного физиологического раствора. Конец зонда отламывают, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Мазки из носа берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного физиологического раствора. Конец зонда отламывают, чтобы он позволил плотно

закрывать крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

При сборе мазков рекомендуется совмещать мазки со слизистых в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после взятия мазков у животного помещаются в одну пробирку с 500 мкл физиологического раствора и исследуются как один образец.

Фекалии (1-5 г) помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Взятие крови для получения сыворотки проводится в пробирку без антикоагулянта.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

Мазки с конъюнктивы и мазки из носа используются без предварительной подготовки.

Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин. до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Переносят сыворотку отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Из фекалий готовят ~10 % (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию центрифугируют при 10-12 тыс об/мин в течение 2 мин. Экстракцию ДНК проводят из 100 мкл надосадочной жидкости.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов - при использовании формы комплектации с электрофоретической детекцией:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,

- амплификация ДНК,
- электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле,
- анализ и интерпретация результатов.

при использовании формы комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Экстракция ДНК из исследуемого материала

А. Экстракция ДНК из исследуемого материала при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп» (при использовании любой формы комплектации)

Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть в термостате при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции).

Для формы комплектации с электрофоретической детекцией:
внести в каждую пробирку по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

Для формы комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»:
внести в каждую пробирку по **300 мкл лизирующего раствора** и по **10 мкл ВКО-FL**. Промаркировать пробирки.

В пробирки с **раствором для лизиса** внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОК**.

Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге. Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при максимальных оборотах и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.

Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для**

преципитации, перемешать на вортексе. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.

Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.

Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.

Центрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °C и до года при температуре от минус 24 до минус 16 °C.

Б. Экстракция ДНК из исследуемого материала при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (при использовании любой формы комплектации)

Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный контроль экстракции).

Для формы комплектации с электрофоретической детекцией:
внести в каждую пробирку по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

Для формы комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»:
внести в каждую пробирку по **300 мкл лизирующего раствора** и по **10 мкл ВКО-FL**. Промаркировать пробирки.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге. Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 2 мин при максимальных оборотах и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.

Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой

пробы.

Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Повторить процедуру отмывки **раствором для отмывки 2**, удалить надосадочную жидкость полностью.

Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

Центрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед. при температуре от 2 до 8 °С, и в течение года при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Аmplификация и детекция продуктов амплификации

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант 50 R-0,5 и электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200 смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F и приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 2.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F и приборов iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 3.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых

реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-1-FRT CAV ½, полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-1-FRT CAV ½, полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT CAV ½ хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «АДЕНОВИР» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru².

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Амплификация

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

В комплекте реагентов для амплификации «ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5 применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-R SAV ½** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2 blue**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-R SAV ½**.

Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой минеральное масло можно не добавлять.

В подготовленные для ПЦР пробирки под масло, или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтром, внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить **контрольные реакции:**

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** - внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
- б) **положительный контроль ПЦР (К1+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК SAV тип 1**.
- в) **положительный контроль ПЦР (К2+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК SAV тип 2**.

Б. Проведение амплификации

Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 1). Когда температура в ячейке амплификатора достигнет 95 °С, поставить программу на паузу, поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 1

Программа для амплификации ДНК аденовирусов плотоядных

цикл	Для амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»)			Для прочих амплификаторов		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95°C	пауза		95°C	пауза	
1	95°C	5 мин	1	95°C	5 мин	1
2	95°C	10 с	42	95°C	1 мин	42
	63°C	10 с		63°C	1 мин	
	72°C	10 с		72°C	1 мин	
3	72°C	1 мин	1	72°C	1 мин	1
4	10°C	хранение		10°C	хранение	

После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР (зону 3).

Образцы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 16 °С (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле (проводится в зоне 3 при помощи комплекта «ЭФ»)

Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельном помещении сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

А. Приготовление рабочих растворов и агарозного геля

Форма 1: **REF** VET-30-R0,5-K; **REF** V-3331-4-5; Форма 2: **REF** VET-30-FRT(RG,IQ)-K; **REF** V-3332-1 /

Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести дистиллированной водой до **500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Бромид этидия - соединение, обладающее репродуктивной и острой токсичностью, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Агарозу для электрофореза ДНК из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой - 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до 65-70 °С.

Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **3 см** друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Б. Порядок работы

Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла по **10-15 мкл проб** и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб

используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В **каждом** ряду дорожек геля должны быть обязательно представлены оба положительных контроля этапа ПЦР **K1+** и **K2+** и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК.

Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон», Россия) и источника питания «Эльф-4» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия) параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза - 18-20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.

По завершении времени электрофореза (краситель при этом пройдет примерно половину длины геля - 1,5 см) выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

Анализ и интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:

Canine adenovirus 1 – 254 п.н.

Canine adenovirus 2 – 775 п.н.

В образце **обнаружена** ДНК *Canine adenovirus 1*, если в дорожке, соответствующей этой пробе, присутствует полоса на уровне **254 п.н.**

В образце **обнаружена** ДНК *Canine adenovirus 2*, если в дорожке, соответствующей этой пробе, присутствует полоса на уровне **775 п.н.**

В образце **не обнаружены** ДНК *Canine adenovirus 1* и *Canine*

adenovirus 2, если в дорожке, соответствующей этой пробе, отсутствуют полосы на уровне **254** и **755** п.н., соответственно.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК (см. табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		254 п.н.	775 п.н.
OK	Экстракция ДНК	Нет	Нет
K-	ПЦР	Нет	Нет
K1+	ПЦР	Есть	Нет
K2+	ПЦР	Нет	Есть

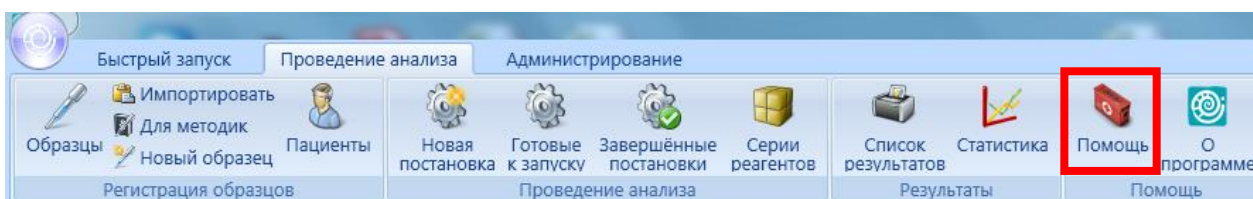
Возможные ошибки:

1. В дорожках, соответствующих положительным контролям (K1+, K2+) отсутствуют специфические полосы 254 или 775 п.н. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. В дорожках, соответствующих отрицательным контролям (OK, K-) присутствуют специфические полосы на уровне 254 и/или 775 п.н. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРИТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

ВНИМАНИЕ! Программирование амплификатора и анализ результатов, полученных в программном обеспечении амплификатора, могут быть выполнены автоматически, с помощью Программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия). Для работы следует использовать программу FRT Manager версии 2.0 или выше. Для ознакомления со всеми возможностями ПО FRT Manager рекомендуем прочитать полное руководство пользователя. Данное руководство располагается в меню «Помощь» вкладки «Проведение анализа» ПО FRT Manager.



См. также Методические Рекомендации по проведению амплификации и анализу результатов при помощи программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия).

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q - программу 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 / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT CAV 1/2,

Форма 1: **REF** VET-30-R0,5-K; **REF** V-3331-4-5; Форма 2: **REF** VET-30-FRT(RG,IQ)-K; **REF** V-3332-1 /

перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FRT *CAV* ½ , ПЦР-буфер-Flu, полимеразу (TaqF), из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *CAV* ½
- 5 мкл ПЦР-буфера-Flu
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF)

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Необходимо избегать попадания сорбента универсального в реакционную смесь.**

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) - внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *CAV1* / *CAV2* / ВКО

Б. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
- В открывшемся окне выбрать меню **Advanced/Детальный мастер** и шаблон запуска эксперимента **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.

- Выбрать тип ротора **36-Well Rotor/36-луночный ротор**. 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 Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки).
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 3

Программа амплификации Adenovir

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	95	15 мин	-	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	-	10
	60	20 с	-	
	72	10 с	-	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	-	35
	55	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 с	-	

Флуоресценцию измеряют при 55 °С на каналах **FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange**.

- 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.детек-мых**. Для обоих красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. сигнал** значение 5FI, а в графе **Max Reading/Максим. сигнал** значение 10FI. В графе **Tube position/Позиция Пробирки** указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр **gain/усиление сигнала**, по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Поставить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform**

Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции. Закройте окно **Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала**, 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 роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

В. Анализ результатов

Анализ полученных результатов можно проводить вручную, с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме, с использованием программного обеспечения FRT Manager.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал ROX/Orange):

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

– В меню **CT Calculation/Вычисление CT** выставить **Threshold/Порог = 0.1**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК аденовируса первого типа (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 нажата кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.

– Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale** видна кнопка **Log scale**).

– В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог фона – ПФ (NTC) – 10 %**.

– В меню **CT Calculation/Вычисление CT** выставить **Threshold/Порог = 0.05**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК аденовируса второго типа (канал JOE/Yellow):

– Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.

– Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.

– В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть нажата кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.

– Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна

справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale** видна кнопка **Log scale**).

- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** выставить **Threshold/Порог = 0.1**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (**Ct**) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** ДНК *Canine adenovirus 1*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение **Ct**, не превышающее 33.

В образце **обнаружена** ДНК *Canine adenovirus 2*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение **Ct**, не превышающее 33.

В образце **не обнаружена** ДНК *Canine adenovirus 1* и *Canine adenovirus 2*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам FAM/Green и JOE/Yellow не определено (отсутствует) значение **Ct** (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу ROX/Orange определено значение **Ct**, не превышающее 28.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение **Ct** превышает 33 на канале FAM/Green или JOE/Yellow, а по каналу ROX/Orange значение **Ct** не превышает 28. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена специфическая ДНК.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу FAM/Green или JOE/Yellow значение порогового цикла

Ct не определено (отсутствует) или превышает 33, и по каналу ROX/Orange значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 28. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу		
		FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	≤ 28
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 25	≤ 25	≤ 25

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и/или ROX/Orange отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 4, Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) и/или для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу FAM/Green, JOE/Yellow и/или ROX/Orange определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-1-FRT CAV ½**, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **ПЦР-смесь-1-FRT CAV ½**, **ПЦР-буфер-Flu**, полимеразу (**TaqF**), из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT CAV ½**
- **5 мкл ПЦР-буфера-Flu**
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по **15 мкл** в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Необходимо избегать попадания сорбента универсального в реакционную смесь.**

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) - внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.**
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК CAV1 / CAV2 / ВКО**

Б. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и

измерение флуоресцентного сигнала.

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания схемы планшета 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, JOE** и **ROX**. 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**.

- Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого 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, JOE** и **ROX**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованную ранее схему планшета, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

Задать программу амплификации:

Таблица 5

Программа амплификации Adenovir

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	10 с	-	10
	60	25 с		
	72	25 с		
3	95	10 с	-	35
	55	25 с	FAM, JOE, ROX	
	72	25 с	-	

Детекция флуоресценции на 2-м шаге (55 °C) блока циклирования.

Форма 1: **REF** VET-30-R0,5-K; **REF** V-3331-4-5; Форма 2: **REF** VET-30-FRT(RG,iQ)-K; **REF** V-3332-1 /

VER 25.07.17 / стр. 27 из 32

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола 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*).
- Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне 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** (*Adenovir.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. Запустить выполнение выбранной программы **Adenovir** с заданной схемой планшета.
- Для прибора **iCycler iQ5** 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** 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 **ОК**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

В. Анализ результатов

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО (канал ROX):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне *Data File* модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу **ROX**, отключив кнопки **JOE** и **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных *PCR Base Line Subtracted Curve Fit* (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- 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**. В опции *PCR Quantification* в меню *Select a Reporter* выбрать значок канала **ROX-575**. При этом должен быть выбран режим анализа данных *PCR Base Line Subtracted Curve Fit* (выбирается по умолчанию). В меню *Threshold Cycle Calculation* выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю *Baseline Cycles* выбрать *Auto Calculated*, а в подменю *Threshold Position* выбрать *User Defined*. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК аденовируса первого типа (канал FAM):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**, отключив кнопки **JOE** и **ROX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных *PCR Base Line Subtracted Curve Fit* (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции *PCR Quantification* в меню *Select a Reporter* выбрать значок канала **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных *PCR Base Line*

Subtracted Curve Fit (выбирается по умолчанию). В меню *Threshold Cycle Calculation* выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю *Baseline Cycles* выбрать *Auto Calculated*, а в подменю *Threshold Position* выбрать *User Defined*. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК аденовируса второго типа (канал JOE):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**, отключив кнопки **FAM** и **ROX**. При этом должен быть выбран режим анализа данных *PCR Base Line Subtracted Curve Fit* (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции *PCR Quantification* в меню *Select a Reporter* выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных *PCR Base Line Subtracted Curve Fit* (выбирается по умолчанию). В меню *Threshold Cycle Calculation* выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю *Baseline Cycles* выбрать *Auto Calculated*, а в подменю *Threshold Position* выбрать *User Defined*. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (**Ct**) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** ДНК *Canine adenovirus 1*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM определено значение *Ct*, не превышающее 33.

В образце **обнаружена** ДНК *Canine adenovirus 2*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE определено значение *Ct*, не превышающее 33.

В образце **не обнаружена** ДНК *Canine adenovirus 1* и *Canine adenovirus 2*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам FAM и JOE не определено (отсутствует) значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу ROX определено значение *Ct*, не превышающее 28.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение *Ct* превышает 33 на канале FAM или JOE, а по каналу ROX значение *Ct* не превышает 28. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена специфическая ДНК.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу FAM или JOE значение порогового цикла *Ct* не определено (отсутствует) или превышает 33, и по каналу ROX значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 28. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 6).

Таблица 6










Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	≤ 28
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 25	≤ 25	≤ 25

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (Ct) по каналам FAM, JOE и/или ROX отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 6, Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) и/или для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу FAM, JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Дата изменения		Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон		Дата изготовления
	Изготовитель		