



ШЕЛКОВСКИЙ  
БИОКОМБИНАТ

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «ЩЕЛКОВСКИЙ БИОКОМБИНАТ»  
(ФКП «Щелковский биокомбинат»)  
п. Биокомбината, г.о. Лосино-Петровский, Московская область, 141142.  
Тел.: (495) 134-58-85, Факс: (495)134-58-85 (доб. 888)  
[www.biocombinat.ru](http://www.biocombinat.ru) E-mail: [info@biocombinat.ru](mailto:info@biocombinat.ru)

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Рекомендуемые настройки для анализа на Rotor-Gene 3000/6000/Q:

Reaction volume/ Объем реакции	25 $\mu$ l
oil layer volume/ объем масла/ воска	15 $\mu$ l
Каналы детекции	Green, Yellow
Calibrate/Gain Optimisation/ Опт.уровня сигн.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Optimise Acquiring/Опт.детек-мых</li><li>- Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции.</li><li>- Min Reading / минимальный сигнал - 5,</li><li>- Max Reading / максимальный сигнал - 10</li></ul>
Позиция Пробирки	1
Perform Calibration Before 1st Acquisition /Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции	да
Автоматический выбор Threshold/Порог	нет
Quantitation analysis/Количественный анализ	Dynamic tube/Динамич. фон – да Slope Correct/Коррект. уклона – да Функцию Коррекция уклона следует отключить, если амплификационные кривые существенно искажаются, например, появляются значения СТ для отрицательных контролей или значения СТ положительных проб существенно увеличиваются, что приводит к искажению значений в таблице результатов или валидности контролей.
More settings/Outlier Removal	NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 % Если для отрицательных контролей наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, изменить «Устранение выбросов» до 15-20 % и оценить прохождение контрольных образцов повторно.
Linear scale/Линейная шкала	да
CT Calculation/Вычисление СТ	Threshold/Порог = 0.01-0.1 Пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей в точке

	перехода экспоненциального подъема флуоресценции в линейный подъем и не пересекать базовую линию. Установить пороговую линию также можно на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К +» в последнем цикле.
Исключить циклы до	5

**Рекомендуемые настройки для анализа на Biorad:**

Reaction volume/ Объем реакции	25 $\mu$ l
Use persistent well factors	да
Base line Cycles	7-13
Threshold	Должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей в точке перехода экспоненциального подъема флуоресценции в линейный подъем и не пересекать базовую линию. Установить пороговую линию также можно на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К +» в последнем цикле.
Linear scale/Линейная шкала	да

**Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе RotorGene:**

*1) Программирование амплификатора:*

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции - 25 мкл**. Для RotorGene 6000 должно быть отмечено окошко **15  $\mu$ L oil layer volume/15 мкл – объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента: Флюоресценцию измеряют на каналах в соответствии с инструкцией. Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт.**
- **Детектируемых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для обоих каналов установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10**. Окно закрыть, **Close/Закрыть**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
- В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

КОПИЯ ВЕРНА  
ЗАМЕСТИТЕЛЬ ДИРЕКТОРА ПО КАЧЕСТВУ  
ФКП "ЩЕЛКОВСКИЙ БИОКОМБИНАТ"  
ГЛАДИЛИНА С.В.

2  
03.10.2022

## 2) Анализ результатов:

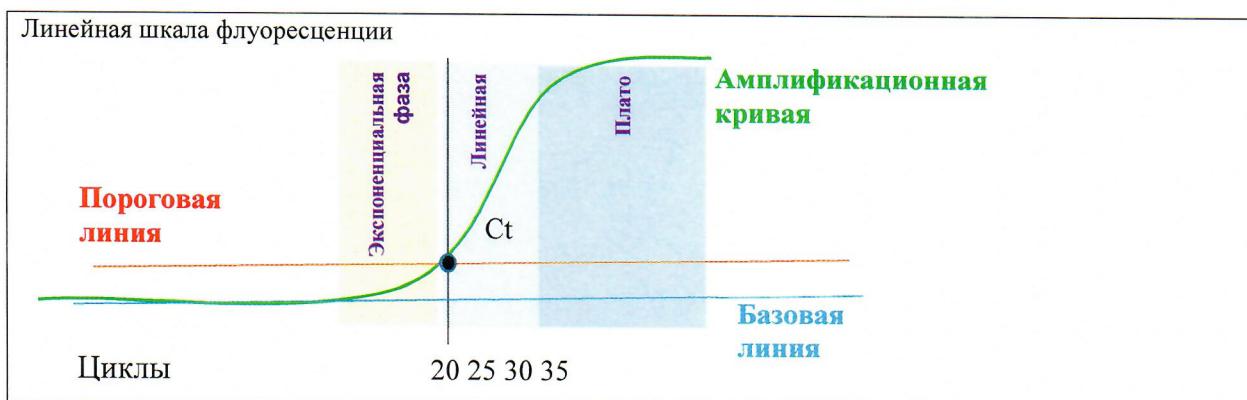
- Нажать в меню кнопку Analysis/Анализ, выбрать режим анализа Quantitation/Количественный, нажать кнопку Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать.
- Отменить автоматический выбор Threshold/Порог.
- В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ должна быть активирована кнопка Dynamic tube/Динамич.фон и Slope Correct/Коррек уклона\*.
- В меню окна More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%\*\*.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала).
- В меню CT Calculation/Вычисление СТ (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0.01-0.1\*\*\*.
- В таблице результатов (окно Quant. Results/Количественные Результаты) появятся значения Ct.
- Исключить циклы до 5.

### Примечание:

\*Функцию Коррекция уклона следует отключить в случае, если амплификационные кривые существенно искажаются, например, появляются значения СТ для отрицательных контролей или значения СТ положительных проб существенно увеличиваются, что приводит к искажению значений в таблице результатов или валидности контролей.

\*\*Если для отрицательных контролей наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, изменить «Устранение выбросов» до 15-20 % и оценить прохождение контрольных образцов повторно.

\*\*\*Пороговая линия устанавливается в пределах значений 0,01-0,1 таким образом, что должна находиться выше уровня фоновой флуоресценции (базовой линии и линий флуоресценции отрицательного контроля или отрицательных проб не имеющих S-образной формы) и должна пересекать S-образную амплификационную кривую или группу кривых в точке перехода экспоненциальной фазы роста флуоресценции в линейную. Установить пороговую линию также можно на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «K +» в последнем цикле.



## Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе BioRad:

Поместить пробирки в амплификатор BioRad

- Для прибора iCycler iQ5 в окне Selected Plate Setup модуля Workshop нажать кнопку Create New или Edit. Редактировать схему планшета в режиме Whole Plate loading. В опции Select and load Fluorophores задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам указанным в инструкции. Задать объем реакции (Sample Volume) 25 мкл, тип крышек (Seal Type), тип пробирок (Vessel Type): Tubes. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку Save&Exit Plate Editing. В окне Selected Protocol модуля

Workshop нажать кнопку Create New или Edit. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку Save&Exit Protocol Editing. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке Protocol (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке Users).

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (Selected Protocol) и схемы планшета (Selected Plate Setup). Для запуска нажать кнопку Run. Выбрать для измерения факторов лунок вариант Use persistent well factors. Нажать кнопку Begin Run, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать OK.

➤ Для прибора **iCycler iQ** в окне Edit Plate Setup модуля Workshop, в опции Samples: Whole Plate Loading задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне Sample Identifier. В опции Select and load Fluorophores задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам флуоресценции. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне Plate Setup Filename и нажав кнопку Save this plate setup (в верхней части экрана). Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку Run with selected protocol.

Выбрать опцию Edit Protocol модуля Workshop. Задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала. Сохранить протокол, задав имя файла в окне Protocol Filename и нажав кнопку Save this protocol (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке View Protocol в модуле Library. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку Run with selected plate setup.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Перед запуском выполнения программы в окне Run Prep следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант Use persistent в меню Select well factor source. Задать объем реакционной смеси в окне Sample Volume – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку Begin Run, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать OK.

➤ Для прибора **CFX96** в стартовом окне открыть Create New Run (или в меню File выбрать New и далее Run). В окне Run Setup выбрать Protocol и нажать Create New. В появившемся окне Protocol Editor – New задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси Sample Volume – 25 мкл. В окне Plate модуля Experiment Setup задать схему расположения планшета (пробирок), а также выставить нужные для эксперимента каналы для флуорофоров. Если набор выявляет один микроорганизм, то в меню Sample Type и выбрать Unknown, нажав на кнопку Select Fluorophores, затем указать галочками требуемые флуорофоры и нажать OK. После этого, галочками задать измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне Sample Name задать название образцов. Сохранить. Открыть крышку прибора, нажав Open Lid и поставить пробирки в соответствующие ячейки, закрыть крышку Close Lid. Запустить прибор Start Run.

#### Анализ результатов амплификации:

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

➤ Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне Data File модуля Workshop и нажать кнопку Analyze. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку Results (iCycler iQ5). Дальнейший учет результатов проводят, используя полученные значения Ct.\*

- Для прибора **iCycler iQ** в модуле Library активировать окно View Post-Run Data. В окне Data Files выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку Analyze
- Data. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку PCR Quant (iCycler iQ). Дальнейший учет результатов проводят, используя полученные значения Ct.\*
- Для прибора **CFX96** в окне модуля Data Analysis во вкладке Quantitation выбрать данные по каналам детекции, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Чтобы установить уровень пороговой линии, необходимо либо перетащить ее с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать меню Baseline Threshold (в ниспадающем меню, вызываемом щелчком правой кнопки мыши по окну графиков флуоресценции), затем выбрать опцию User Defined и внести нужное значение в текстовое поле. В поле для **Base line Cycles** рекомендуется установить циклы с 7 по 13. Вид шкалы – линейный.

Результаты обрабатывают для каждого канала по-отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.

\***Пороговая линия** (Ct) должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию. Установить пороговую линию также можно на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «K+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле для **Crossing Threshold**. Важно, чтобы график флуоресценции для образца «K+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

### **Проведение амплификации и анализ результатов прибором ДТ-96**

1. Включить прибор и запустить программу «RealTime\_PCR v.7.3».

В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим Работа с прибором.

2. В диалоговом окне «Список приборов» выбрать необходимый прибор и нажать кнопку Подключить.

3. В меню Тест выбрать команду Создать новый тест, ввести название нового теста и нажать кнопку OK. В появившемся окне Тест задать следующие параметры:

Тип – качественный

Метод – Пороговый (Ct)

Пробирки – образец, контроль +, контроль –

Контроли: положительный (K+) – 1, отрицательный (K-) – 1

Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл

Флуорофоры – в соответствии с инструкцией

Задать программу амплификации в соответствии с инструкцией и нажать OK.

#### **Анализ результатов амплификации:**

1. Перейти в режим Просмотр архива и открыть сохраненный файл данных.

Указать в выпадающем списке Тип анализа: Ct (Cp) для всех каналов.

2. Указать в выпадающем списке Метод: Пороговый (Ct).

3. Кнопка Фитирование (сглаживание кривых) должна быть включена.

4. Нажать кнопку Изменить параметры анализа и установить критерий положительного результата 70 %, выставить критерии положительных результатов по нижней и верхней границам 10 %. Опцию Нормализация данных не использовать (галочка напротив соответствующей графы должна отсутствовать).

5. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления

сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне 5-10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала K +.

6. Результаты исследования (значения Ct по каждому из каналов) отображаются в таблице справа.

### **Порядок работы на приборе LightCycler-96**

Запустите прибор LightCycler 96, дождитесь окончания тестирование (см. инструкцию к прибору).

1. Откройте программу LightCycler-96.
2. Выберите пункт Create new Experiment (создать новый эксперимент) либо в панели инструментов кликните по значку New Experiment.
3. В открывшемся окне выберете вкладку Run Editor, в Programs откройте окно Predefined Programs. В данном окне выберете Preincubation, нажмите кнопку Add, после чего в левой части экране Programs появится стадия Preincubation. Аналогичным образом добавьте еще одну стадию Preincubation и стадию 2 step Amplification, после чего закройте окно Predefined Programs.

Задайте параметры температурно-временного режима амплификации в соответствии с инструкцией:

Для этого в левой верхней части окна в разделе Programs выберете Preincubation, далее в нижней правой части, в разделе Temperature задайте необходимое время в секундах (Duration) и температуру (Target).

В левой верней части окна в разделе Programs выберете 2 step Amplification и для каждого шага детекции аналогичным образом задайте необходимые время и температуру. Шаги детекции переключаются в левой нижней части окна в разделе Steps. В разделе Acquisition Mode на нужной стадии необходимо указать считывание сигнала (single).

В столбце Cycles с помощью стрелок вверх и вниз задайте необходимое число циклов для каждого этапа.

В окне Reaction Volume, в разделе Measurement (в правой части окна) укажите объем реакции равный 25 мкл.

4. Перейдите на вкладку Sample Editor (правка образцов). Пустые лунки следует удалить, оставив только значимые данные, для чего выделите пустые ячейки с помощью левой кнопки мыши и нажмите кнопку в правой нижней части раздела Clear wells: В окне Gene задайте наименования мишней.

В правой части, в разделе Reaction properties отредактируйте образцы: задайте названия и установите тип исследуемых образцов (Type Positive control для положительных образцов, Type Negative control для отрицательных контрольных образцов, Type Unknown для исследуемых образцов и ВК- (ОКО)).

5. В панели инструментов кликните по значку Save Experiment, чтобы сохранить новый эксперимент.

После открытия диалогового окна Save As выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите Save. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла LightCycler-96 (.lc96)

6. Эксперимент необходимо перенести в прибор: если прибор подключен через сетевой кабель (либо через WiFi) к компьютеру, то можно загрузить эксперимент через открытую рабочую программу LightCycler96, либо, если прибор автономен, можно воспользоваться USB носителем.

- 6.1 Перенос эксперимента в прибор с помощью USB носителя.

Вставьте USB носитель с сохраненным на нем файлом эксперимента (.lc96) в порт USB, расположенный на правой панели прибора. Как только значок USB появится на панели состояния программы прибора LightCycler-96, файл эксперимента будет добавлен в таблицу экспериментов во вкладке Overview. Для того чтобы перенести файл на прибор (и наоборот), необходимо нажать Synchronize. Постановку эксперимента можно проводить

напрямую с USB носителя, после ее успешного завершения данные будут автоматически сохранены на USB носителе.

## 6.2. Перенос эксперимента в прибор с помощью рабочей программы LightCycler-96.

После сохранения эксперимента нажмите Show Startap Wizard. В появившемся окне выберите Instrument Manager:

В поле Instrument должен отобразиться прибор LightCycler. Затем перейдите на вкладку Send/Recieve Experiment и в окне You PC выберите сохраненный эксперимент и нажмите. Эксперимент будет скопирован в память прибора. Дальнейший запуск программы необходимо производить с помощью сенсорной панели на самом приборе LightCycler-96.

## 7. Запуск эксперимента.

Эксперимент запускается с помощью сенсорной панели управления на передней части прибора.

Загрузите плашку либо пробирки с образцами в прибор LightCycler-96. Нажмите Start на боковой панели общих команд основного окна программы прибора.

Выберите вкладку Raw Data, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

## 8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

### Анализ и интерпретация результатов:

Откройте файл завершенного анализируемого эксперимента (со значком) в рабочей программе LightCycler-96. Откройте вкладку Analysis. На панели инструментов кликните по значку Add Analysis, чтобы добавить новый анализ.

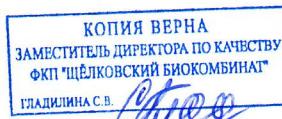
Откроется диалоговое окно Create New Analysis. Выберите Abs Quant и нажмите OK. Во вкладке Analysis в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента:

- Кривые амплификации
- Стандартные кривые
- Термальная карта
- Таблица с результатами

Необходимо визуально оценить кривые амплификации как в сыром виде (вкладка Raw Date), так и после анализа (вкладка Analysis).

Установить в разделе Analysis setting значение minimal EPF таким образом, чтобы пороговая линия (Ct) пересекала только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекала базовую линию и линии флуоресценции отрицательного контроля и отрицательных образцов не имеющих S-образной формы. Установить пороговую линию также можно на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «K +» в последнем цикле амплификации.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с таблицей по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца. На термальной карте зеленым цветом обозначаются положительные образцы, красным цветом обозначаются отрицательные образцы.



03.10.2022