

Виділяємо нуклеїнові кислоти

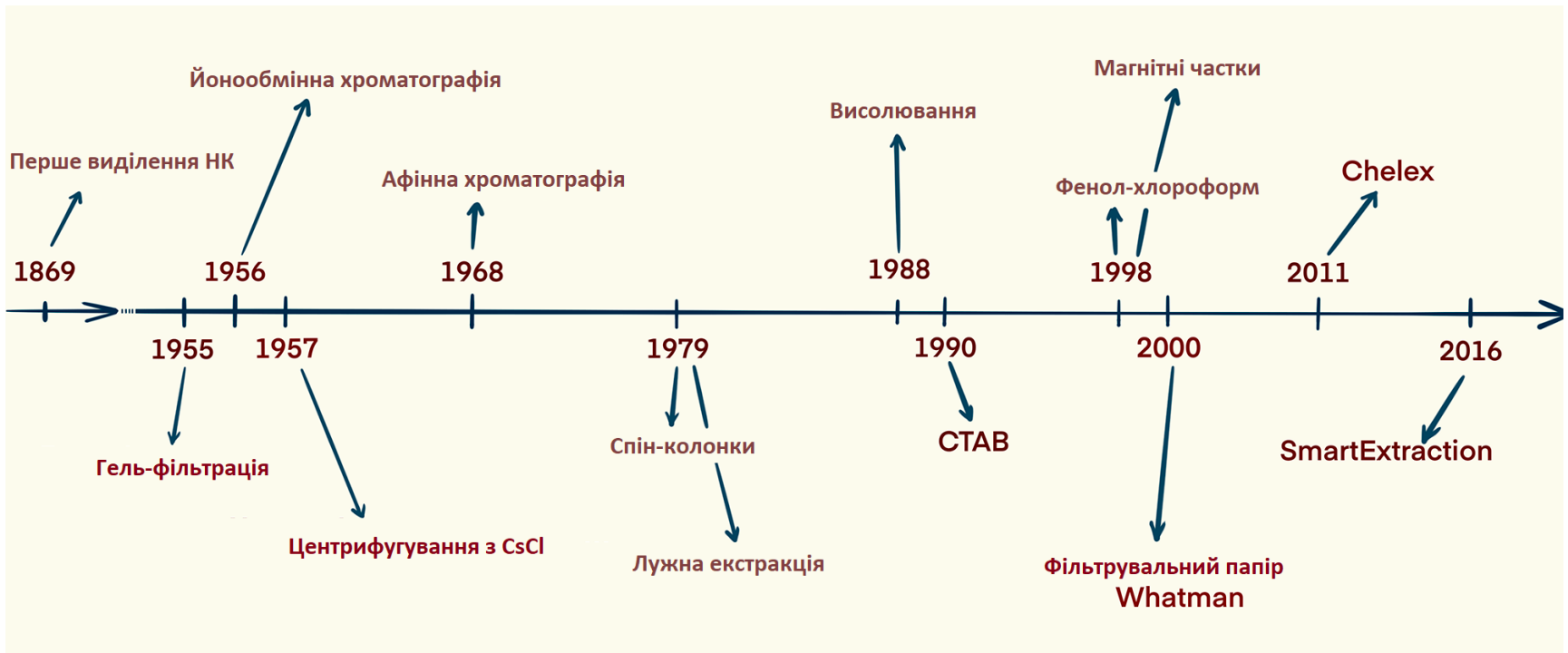
- Лора Чернишова,
- Офіцер з лабораторій
- Бюро ВОЗ в Україні,
- chernyshoval@who.int
- +38-063-639-56-65



**World Health
Organization**

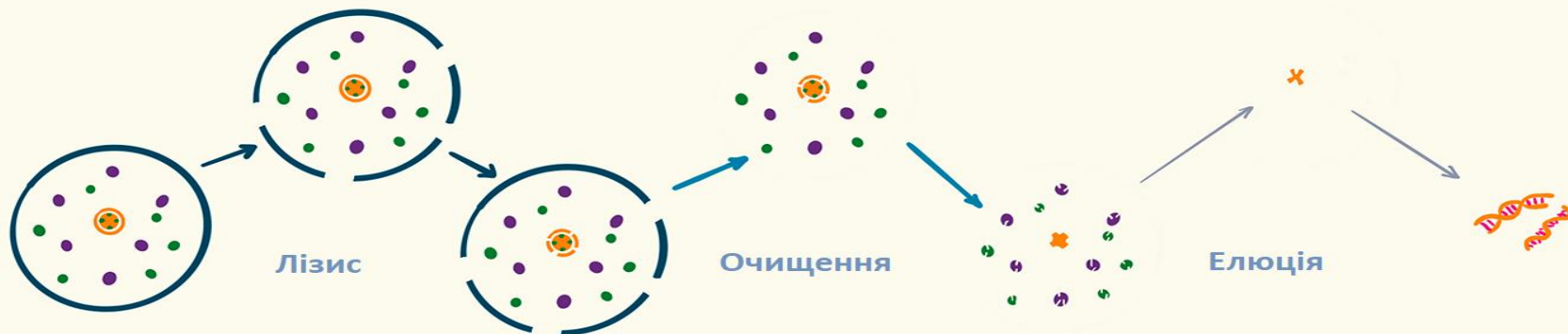
Ukraine

Історія виділення НК



Вимоги до методів екстракції НК

- ❑ Прості, не вимагають високоспеціалізованого обладнання
 - ❑ Економічні за часом виконання
 - ❑ Включають в себе безпечні реактиви, а процес їх виготовлення повинен виключати можливість контамінації
 - ❑ Можуть бути модифіковані під методики, з якими планується подальша робота.
 - ❑ Високий вихід та висока ступінь очищення ДНК, максимальне видалення інгібіторів ПЛР
 - ❑ Мінімальна втрата ДНК інфекційних агентів під час екстракції, цілісність мішені НК
 - ❑ Низький ризик перехресної контамінації «від зразка до зразка», контамінації геномною ДНК.
 - ❑ Специфічність – підходять для екстракції НК з того типу зразка, з яким працює лабораторія
 - ❑ Сумісність - адаптовані під обладнання для екстракції, встановлене в лабораторії
 - ❑ Сертифіковані, попередньо кваліфіковані референс-лабораторіями
 - ❑ Відтворюваність результатів
 - ❑ Адаптовані під широкий спектр видів біоматеріалу
 - ❑ Можливість сервісної підтримки та своєчасної відповіді на рекламації
 - ❑ Можливість виділяти як ДНК, так і РНК, та (бажано) – відділяти ці молекули
-



Основні реагенти для екстракції НК

- **Трис-буфер** – контролює рН, взаємодіє з ліпополісахаридами, підвищує проникність мембран, лізує клітинні мембрани
 - **ЕДТА** – працює як хелатуючий агент, блокує потребу в кофакторі фермента ДНКазі, тим самим попереджуючи деградацію ДНК
 - **Детергенти (SDS, Tween-20)** – руйнують клітинні мембрани, солюбілізує білки ядерних та клітинних мембран
 - **NaCl** – нейтралізує негативний заряд ДНК, стабілізує молекулу
 - **MgCl₂** – захищає та стабілізує ДНК, блокуючи негативний заряд ліпопротеїдів
 - **Фенол, хлороформ** – осаджує білкові домішки, допомагає відділити ДНК від інших клітинних компонентів
 - **Гуанідину тіоціанат / гуанідину гідрохлорид** – працює як хаотропний агент, руйнує клітинні мембрани, інактивує клітинні нуклеази
 - **Спирти** (етанол, пропанол) – використовуються для відмивання НК від клітинних компонентів, а також для преципітації НК в преципітаційних методиках. Розчини для відмивання з високою концентрацією етанолу (96-100%) корисні для підсушування сорбенту перед елюцією
 - **Ефір, ацетон** – можуть використовуватись для додаткової депротеїнізації ДНК
 - **Ферменти** (протеїназа К) – руйнують нуклеопротейні комплекси
 - **Бета-меркаптоетанол** – елімінує РНКазу, яка вивільнюється при руйнуванні клітин, використовується для виділення РНК, попереджаючи її розщеплення під час екстракції
-

Підходи до екстракції НК

Хімічні



- Лужна екстракція
- Висолювання
- СТАВ
- Фенол-хлороформ
- Ферменти
- Аніонообмінні смоли

Фізичні



- Хроматографія
- Центрифугування
- Спін-колонки
- Магнітні частки
- Скляні бусини
- Фільтрувальний папір

Методи екстракції НК

Складні

- Більш трудомісткі
- Висока ефективність виділення ДНК/РНК
- Висока ефективність видалення інгібіторів
- Спрощені вимоги до забору клінічного матеріалу (домішки слизу, крові, гній, продукти залізниці бактерій)

Сорбція ДНК/РНК на носії та видалення інгібіторів промиванням, преципітація ДНК/РНК

Прості

- Швидкі у виконанні
- Низька ефективність виділення ДНК
- Низька ефективність очищення від інгібіторів
- Вищі вимоги до забору клінічного матеріалу
- Не придатні для екстракції РНК!

Кип'ятіння, розведення, зв'язування інгібіторів ПЛР

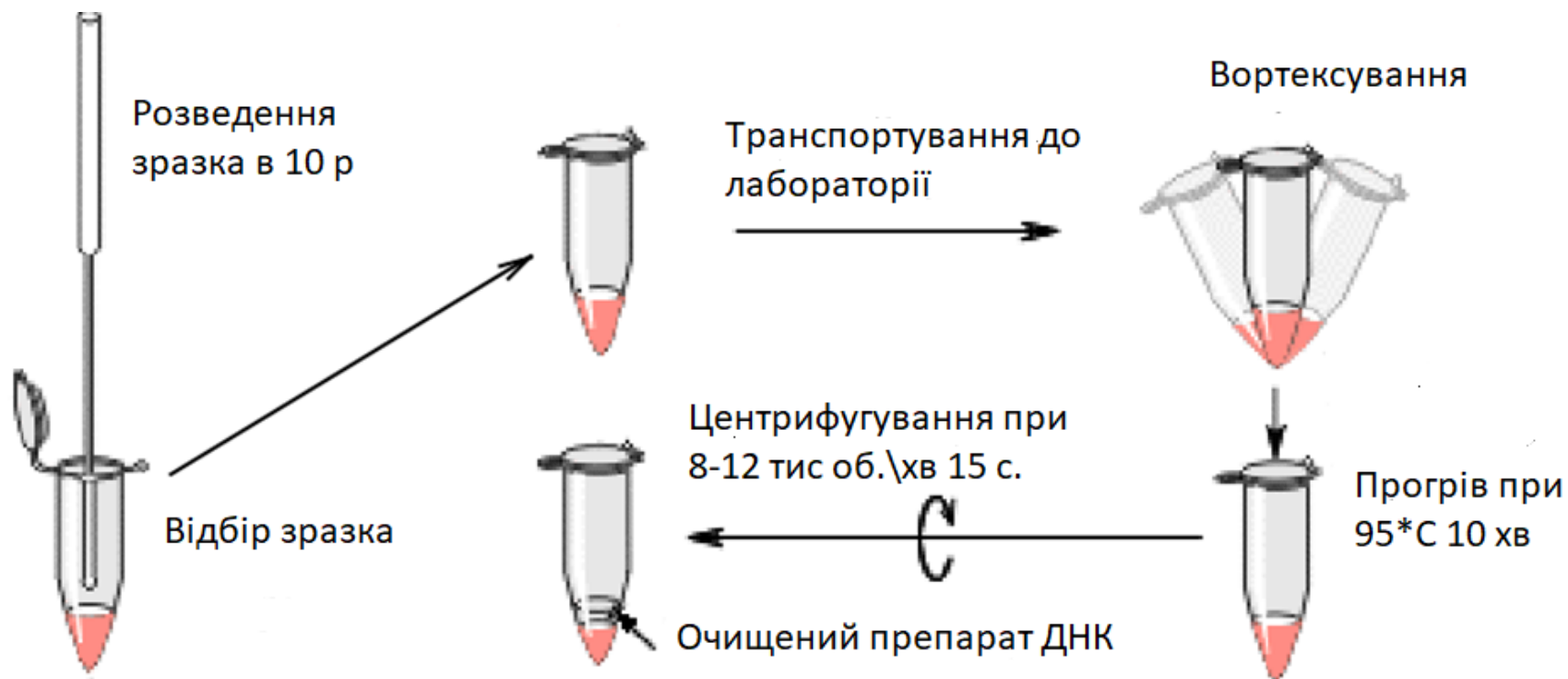
Прості методи екстракції ДНК

- Лізис детергентами, які не інгібують ПЛР → прогрівання або без нього.
 - Лізис детергентами, що не інгібують ПЛР → протеїназна обробка.
 - Лізис детергентами, які не інгібують ПЛР → сорбція білків на афінних носіях типу Chelex-100 (низька ємність сорбенту, рекомендується тільки для клітинних та бактеріальних культур).
-

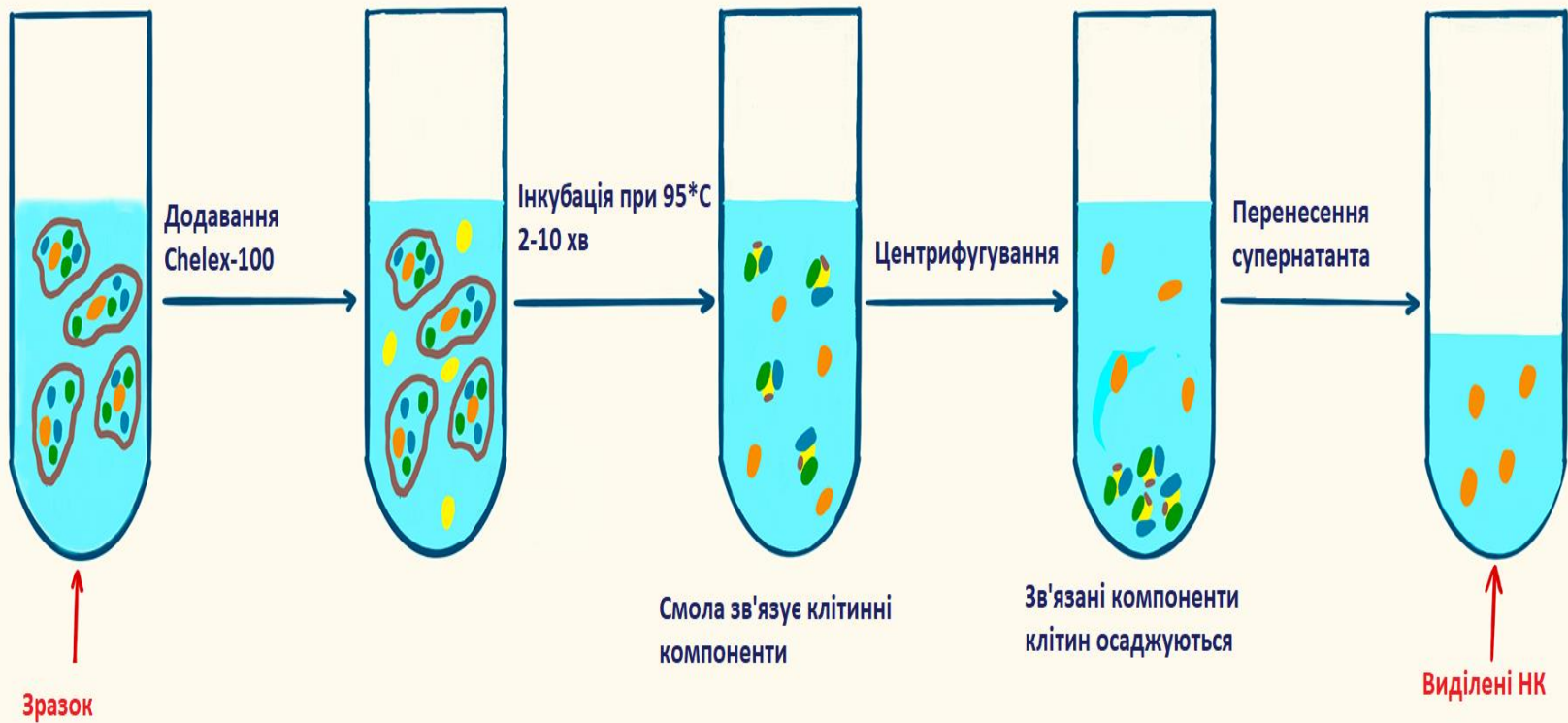
Прості методи екстракції ДНК

- **Рекомендовані види біоматеріалу:**

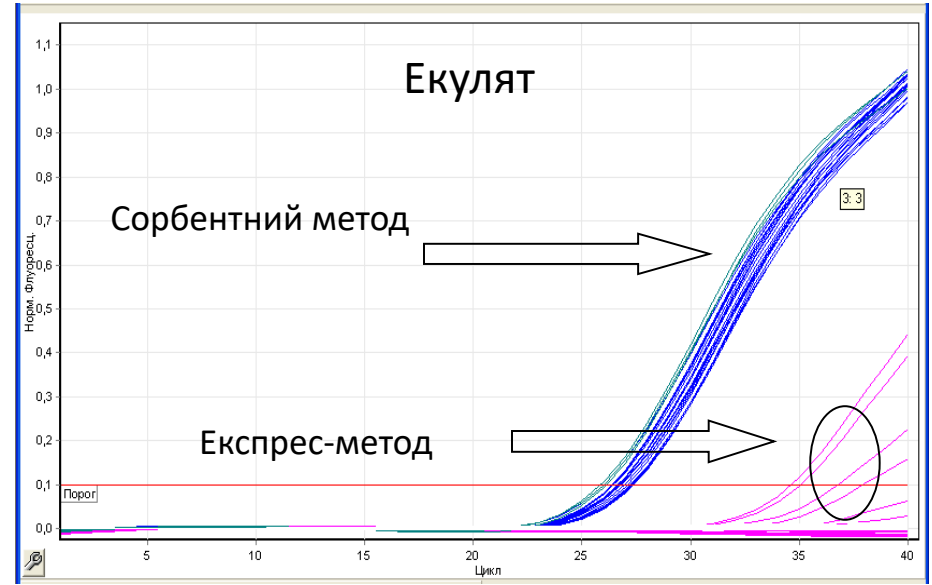
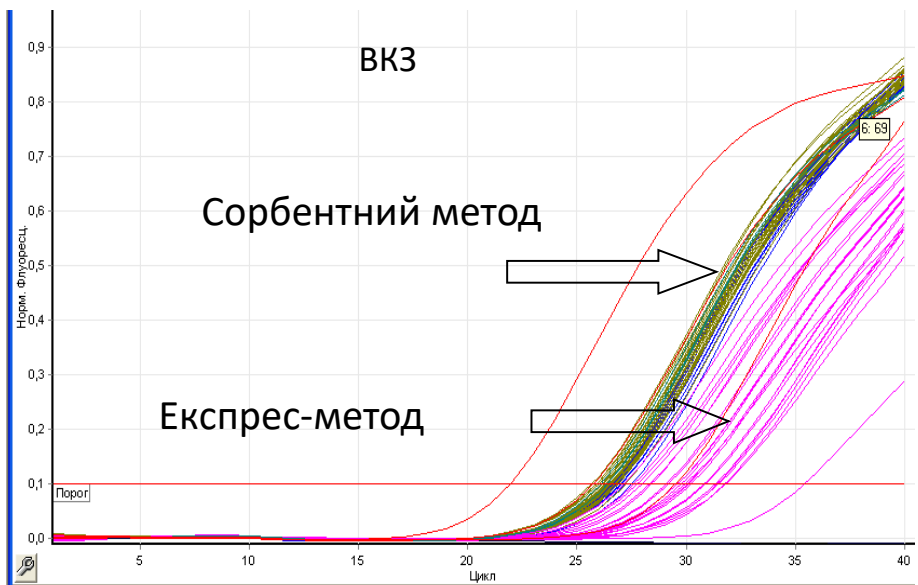
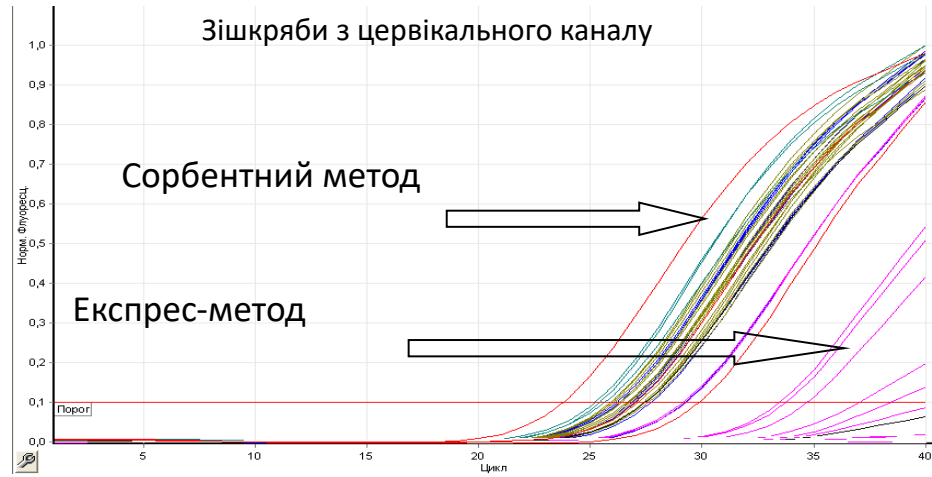
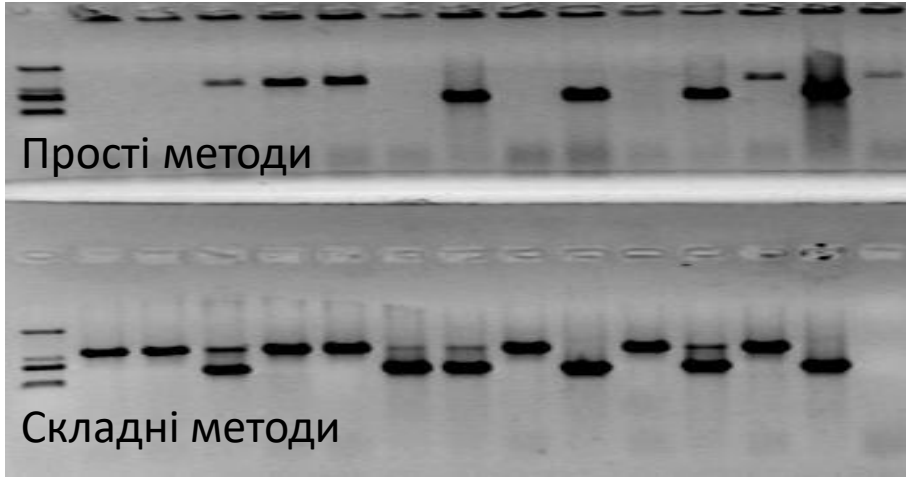
- Зішкряби \ мазки з цервікального каналу, уретри, піхви;
- змиви з слизової оболонки очей та носоглотки;
- сперма;
- слина;
- суспензія осаду ранкової сечі;



Аніонообмінні смоли типу Chelex



Прості vs. складні методи екстракції

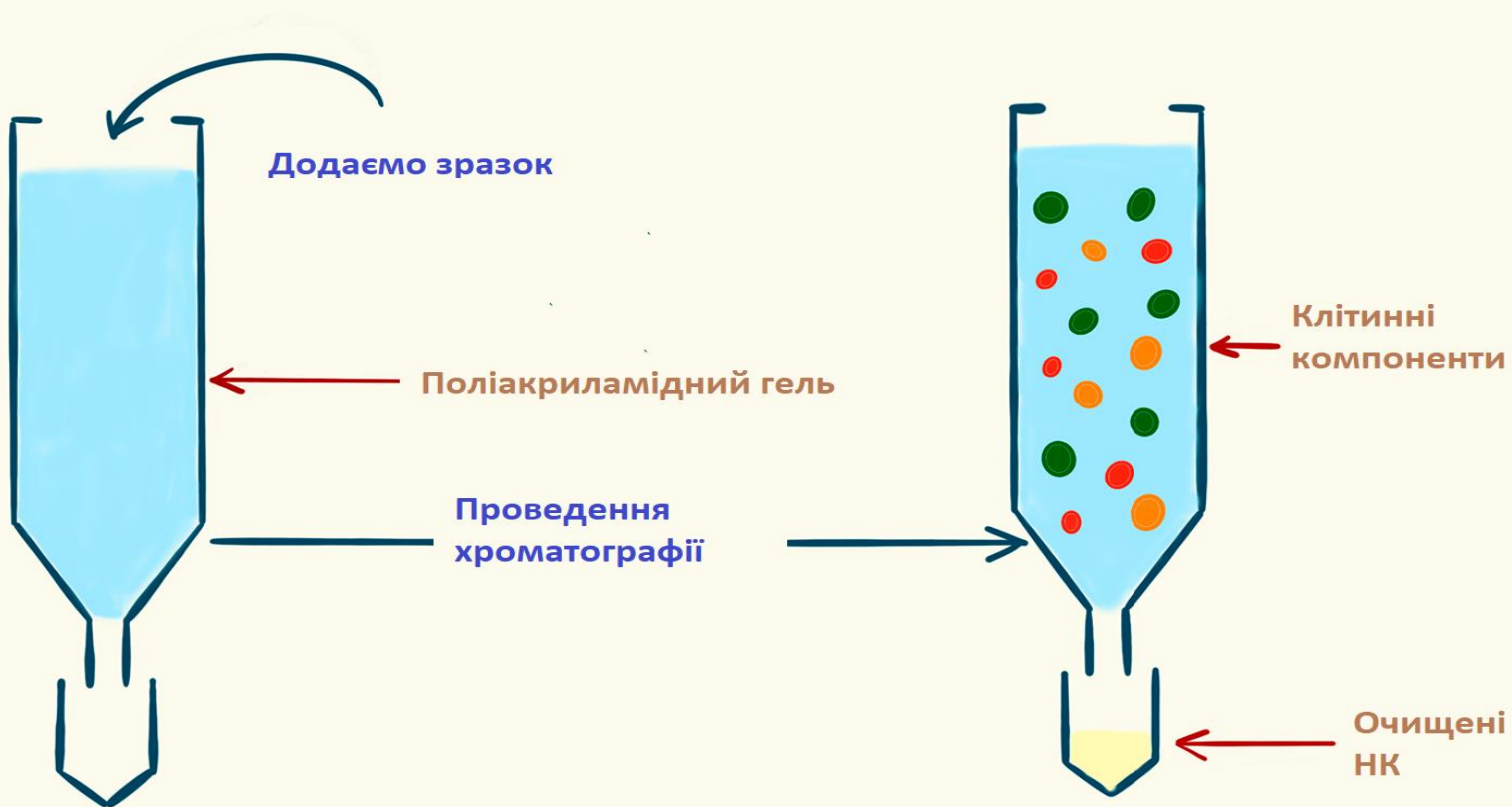


Ефективність екстракції геномної ДНК людини < 1% (непридатні для виявлення ВПЛ)

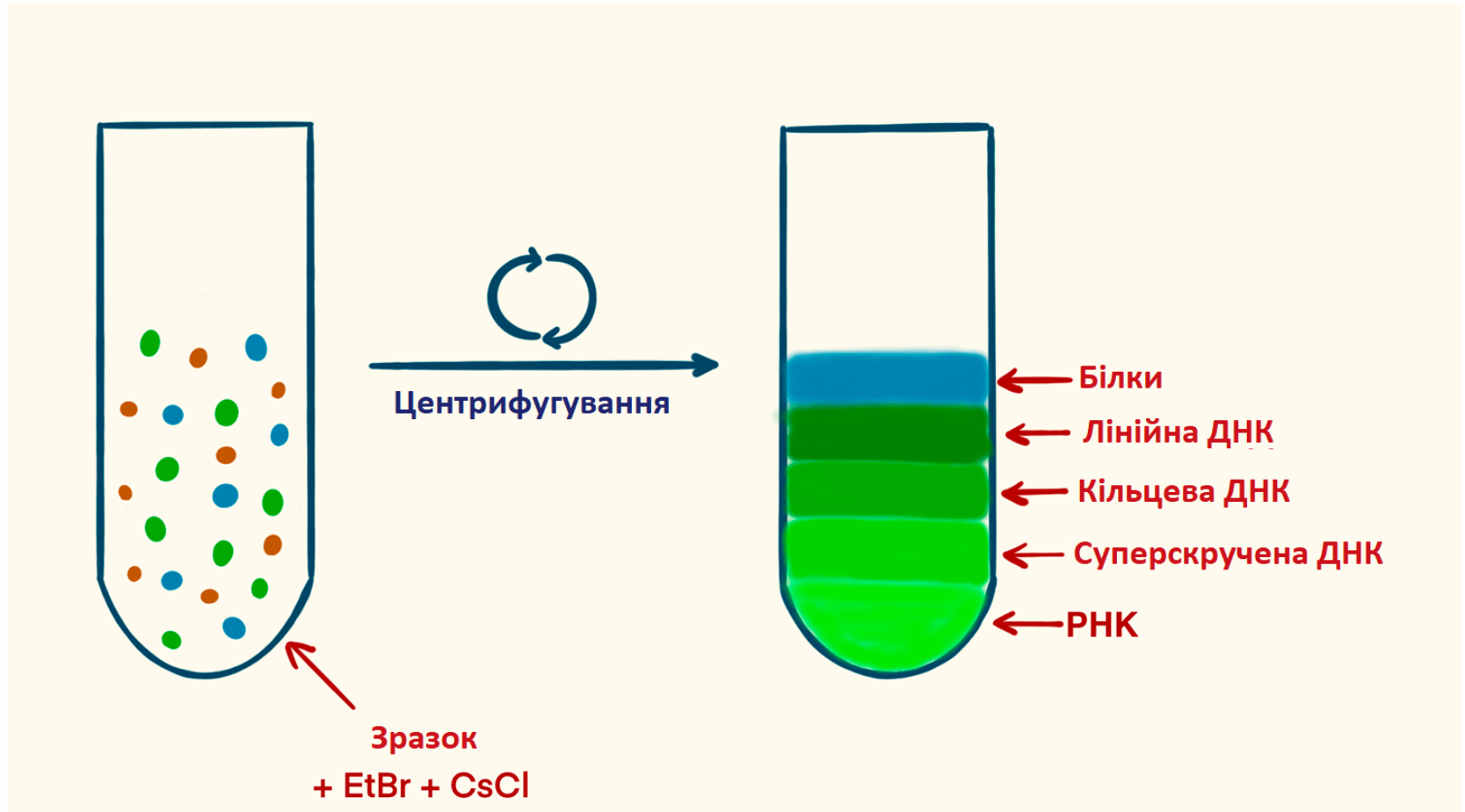
Експрес методи екстракції ДНК/РНК

- Псевдо-повне виділення ДНК
 - Псевдо-повне видалення інгібіторів
 - Псевдо-повна захищеність від контамінації
 - Псевдо-швидка екстракція
 - Неможливість проведення кількісних досліджень
 - Неможливість використання методів ампліфікації РНК (ОТ-ПЛР, NASBA)
-

Хроматографічні методи

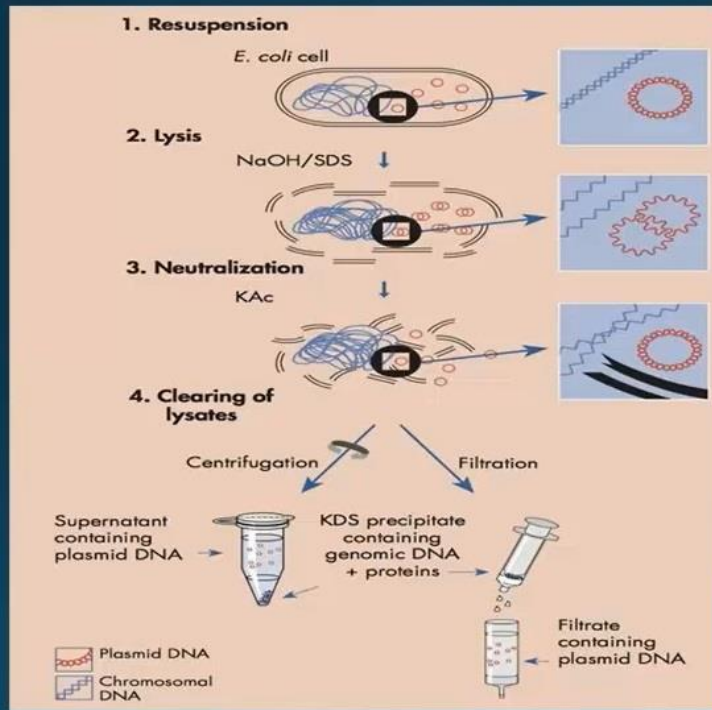


Центрифугування в градієнті хлористого цезію



Лужна екстракція

Principle of Plasmid Isolation



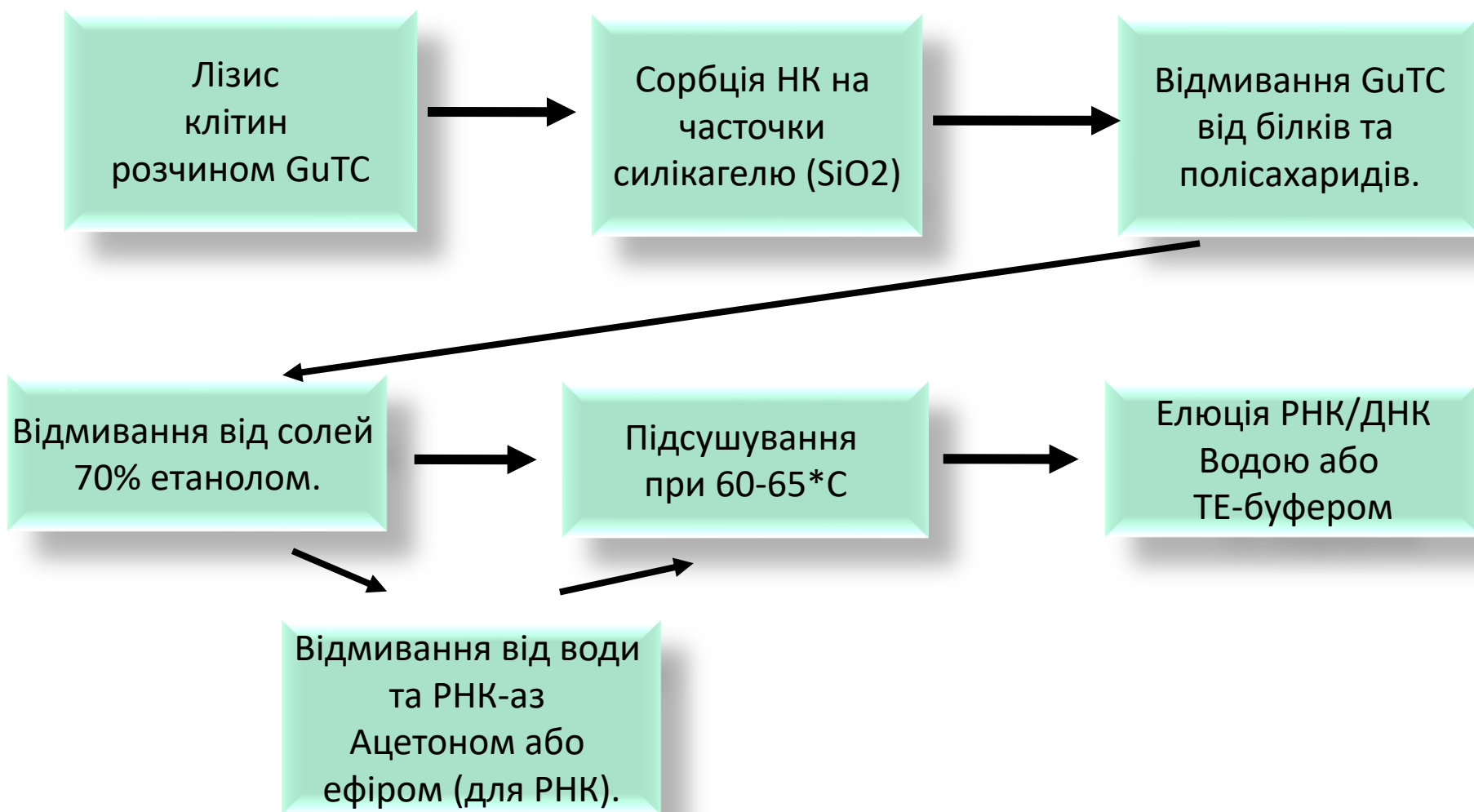
Resuspension

Lysis

Neutralization

Clearing of Lysate

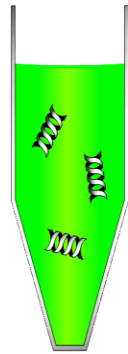
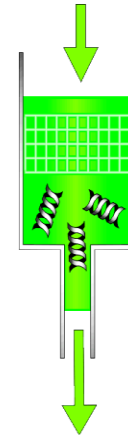
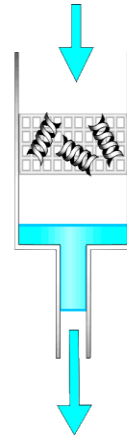
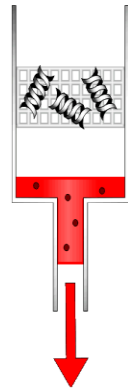
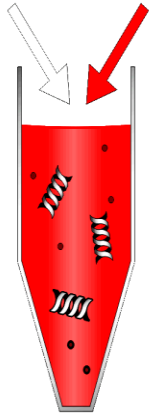
Твердофазна екстракція. Виділення РНК/ДНК сорбцією на силікагелі у присутності гуанідинтіоціанату



Виділення нуклеїнових кислот сорбцією на скловолоконних фільтрах спін-колонок

Зразок

Лізуючий розчин



Лізис

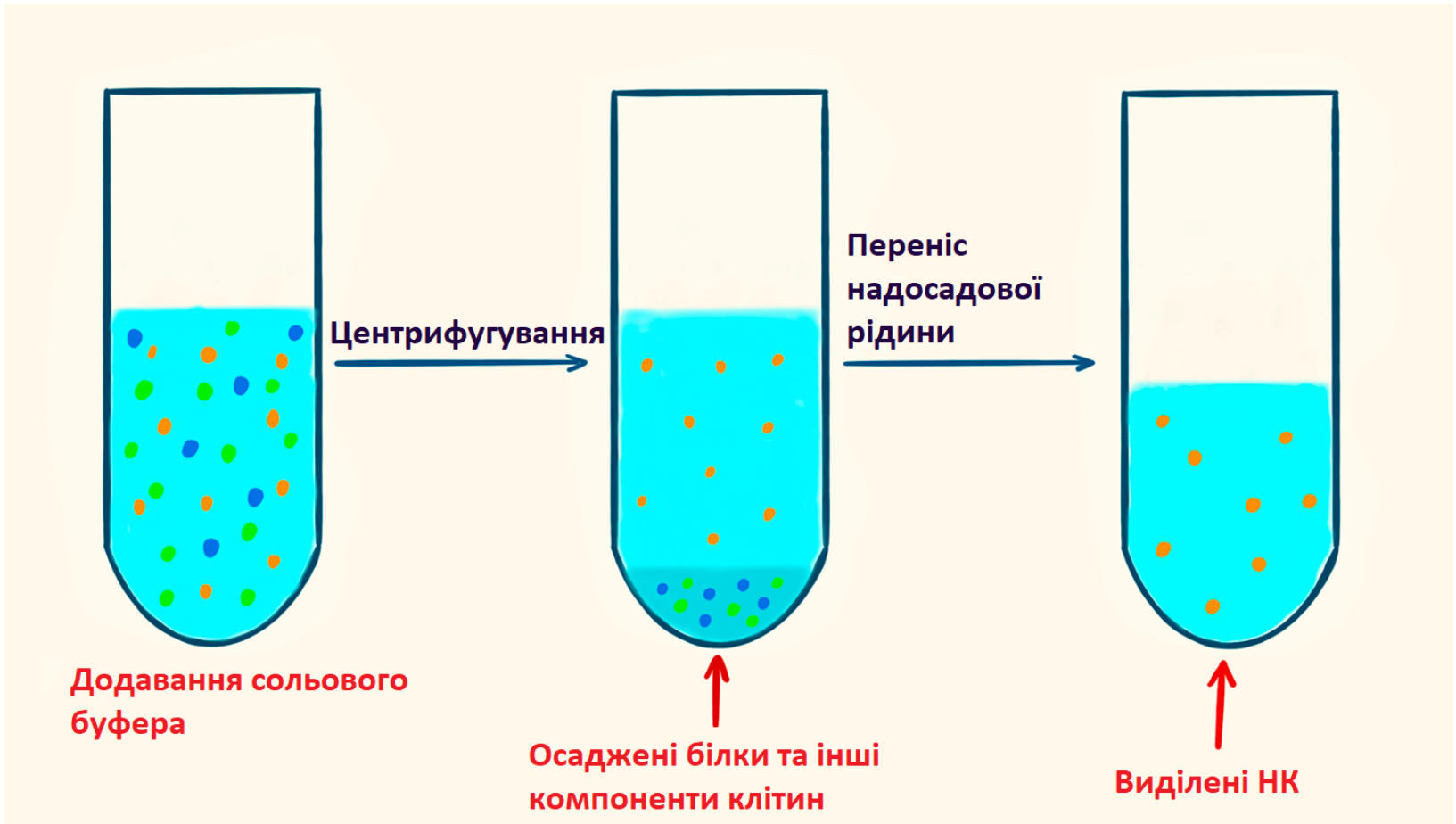
Сорбція
ДНК/РНК

Відмивання

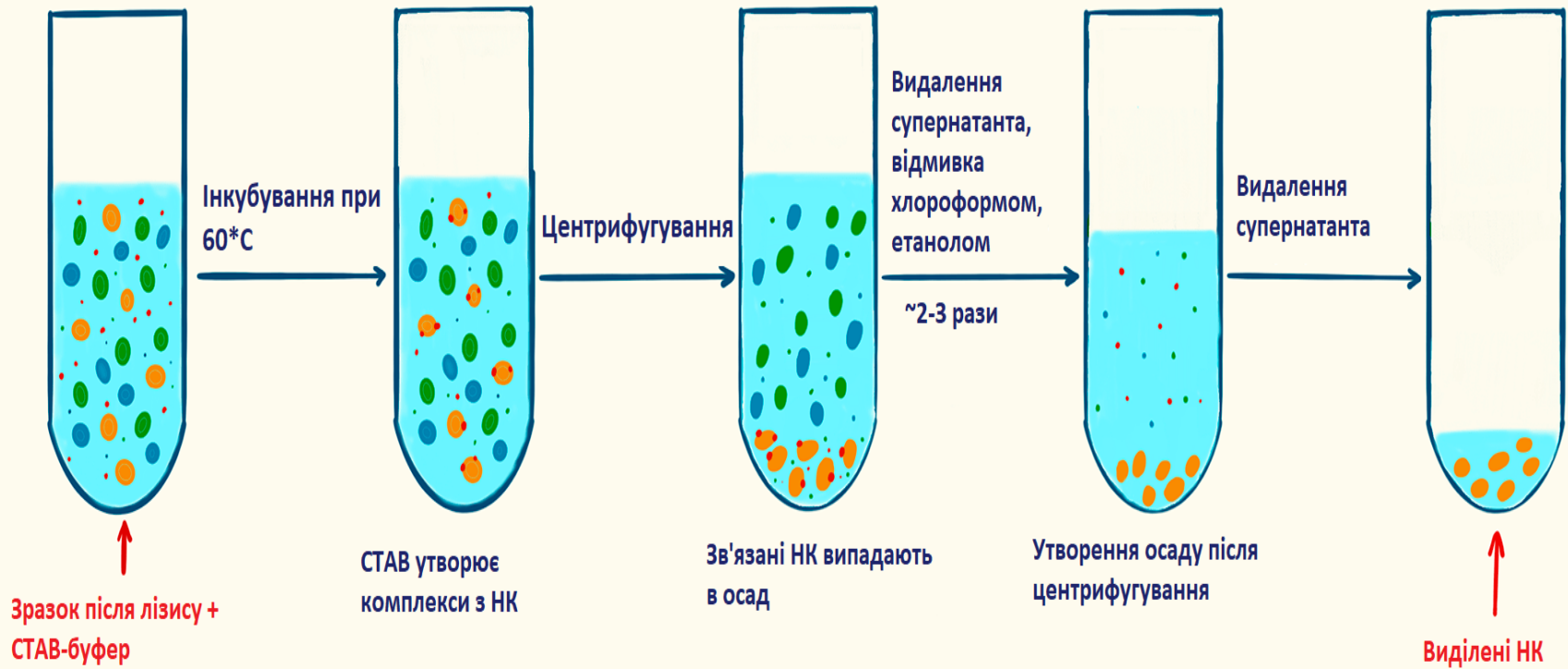
Елюція
ДНК/РНК

Перенос очищеної НК
в чисту пробірку

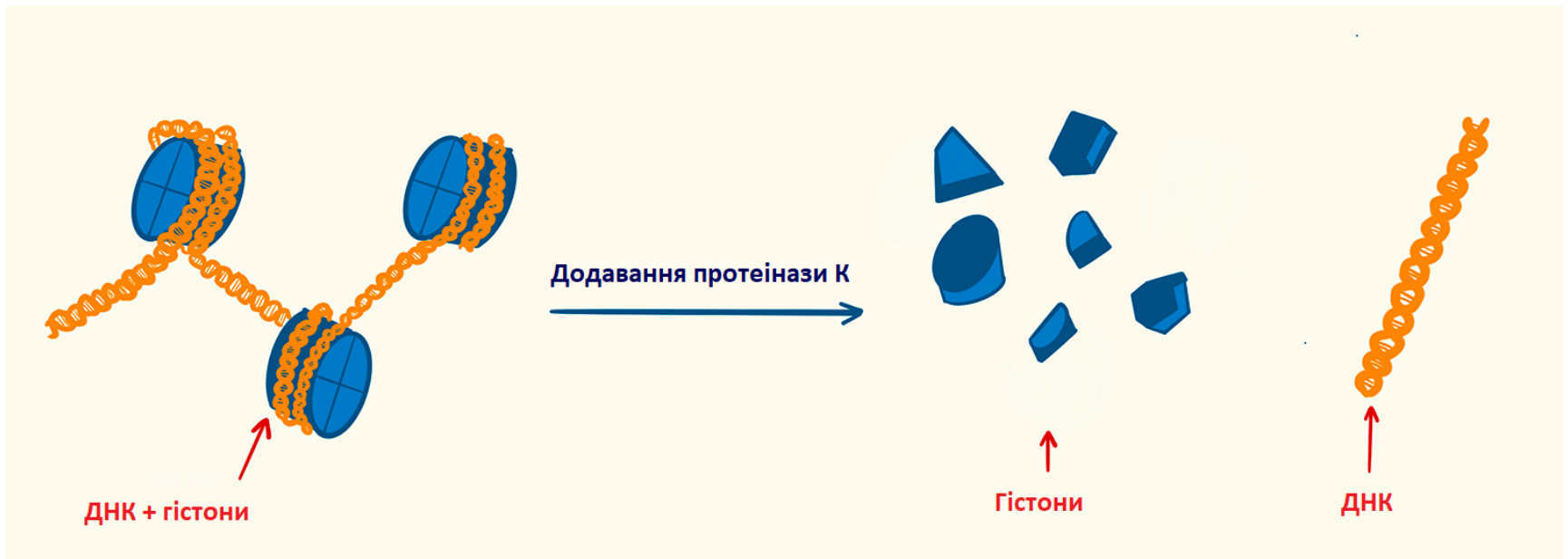
Висолювання



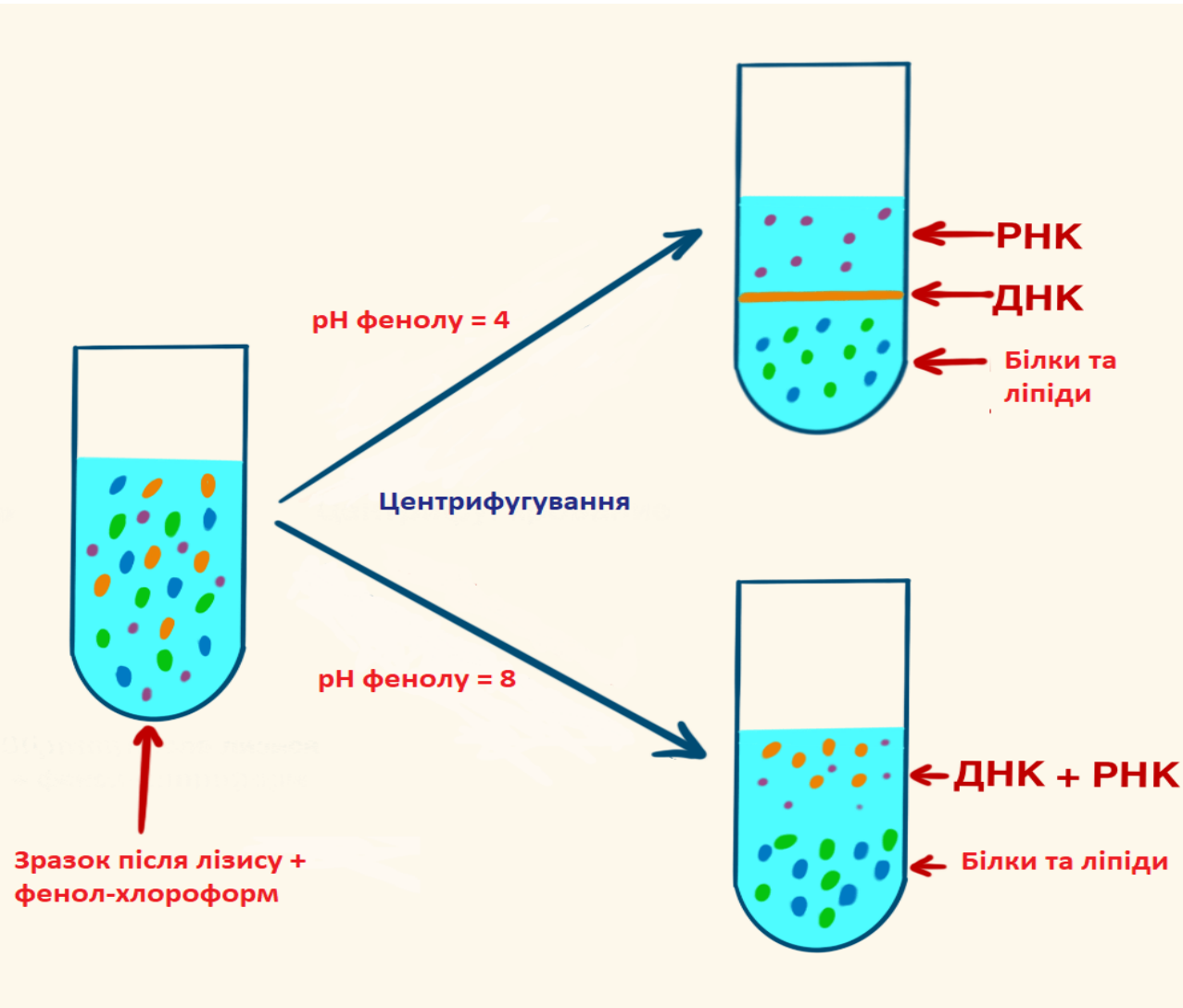
Виділення рослинної ДНК СТАВ-буфером



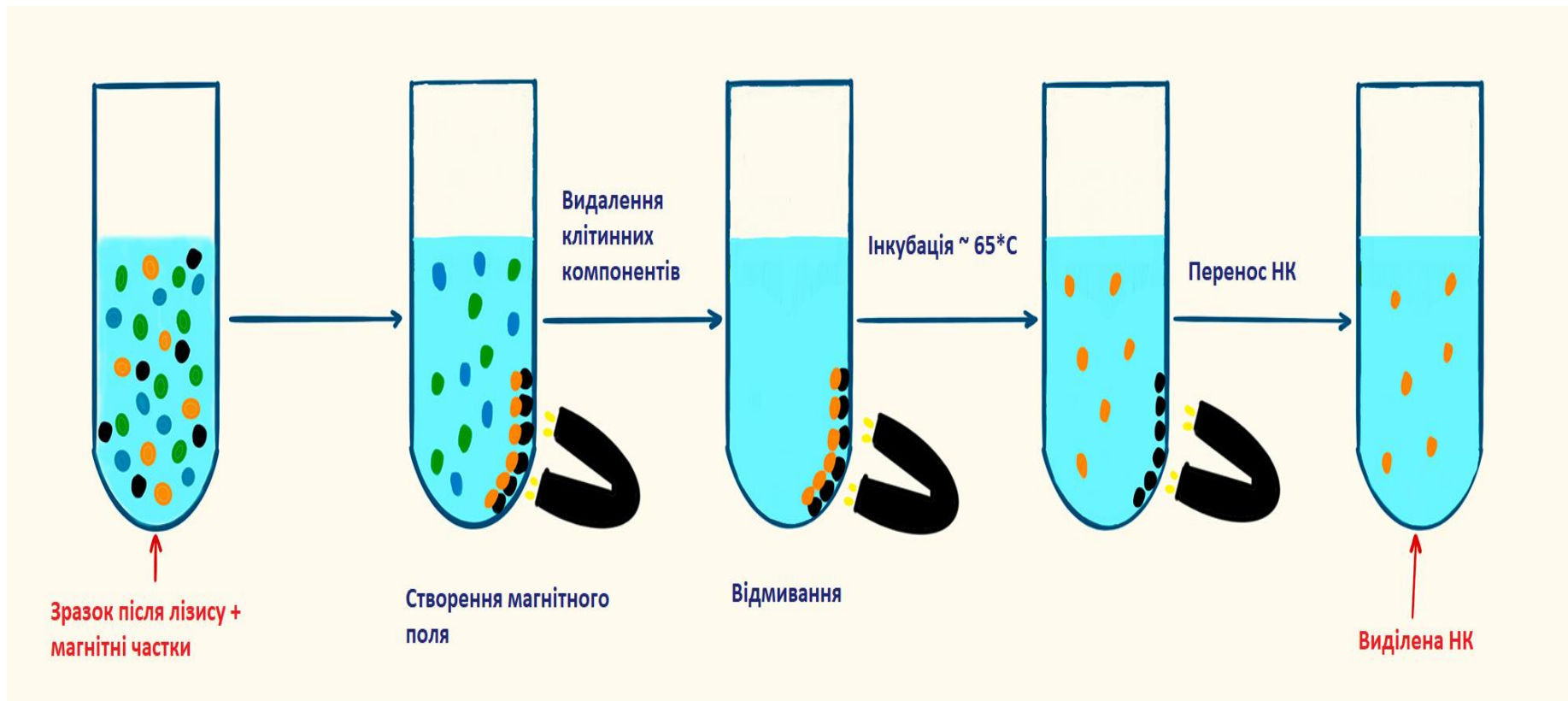
Ферментативна екстракція



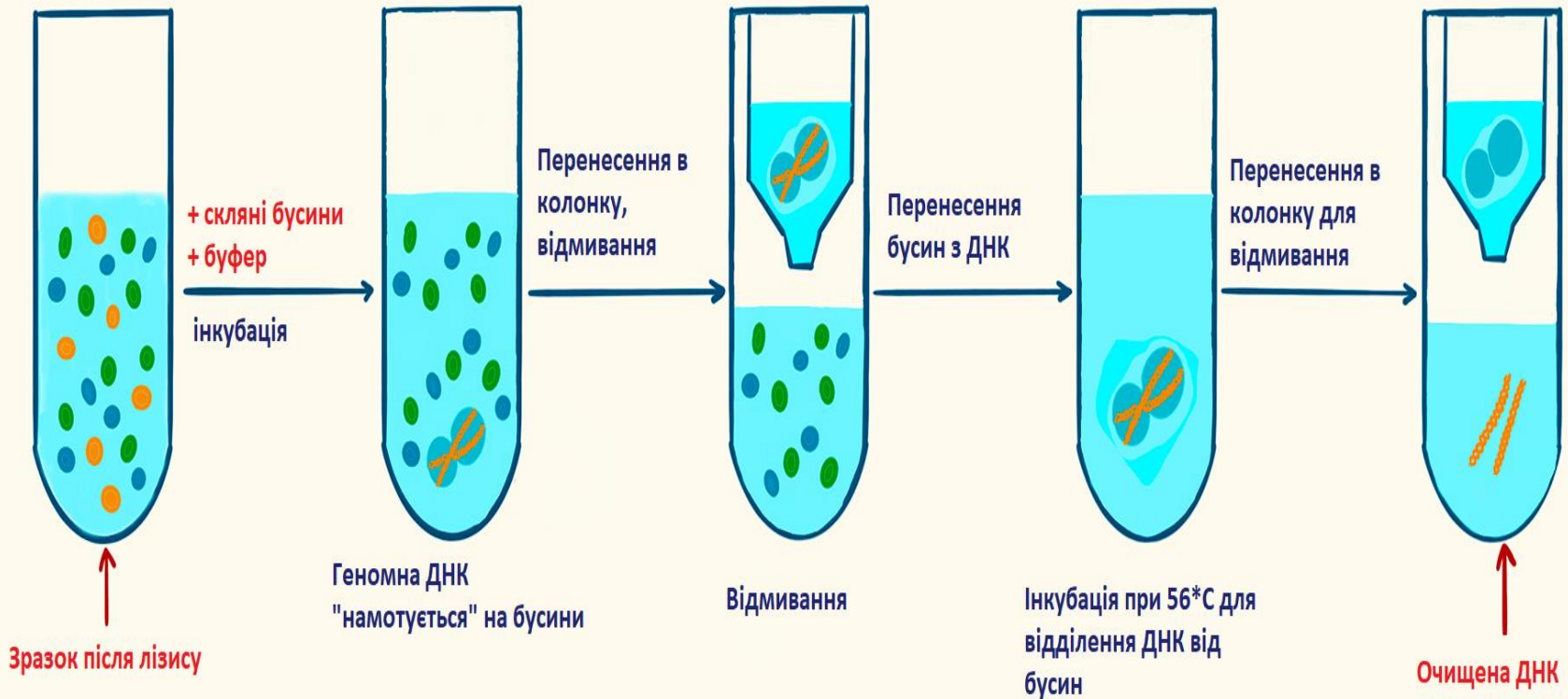
Виділення за допомогою фенол-хлороформу



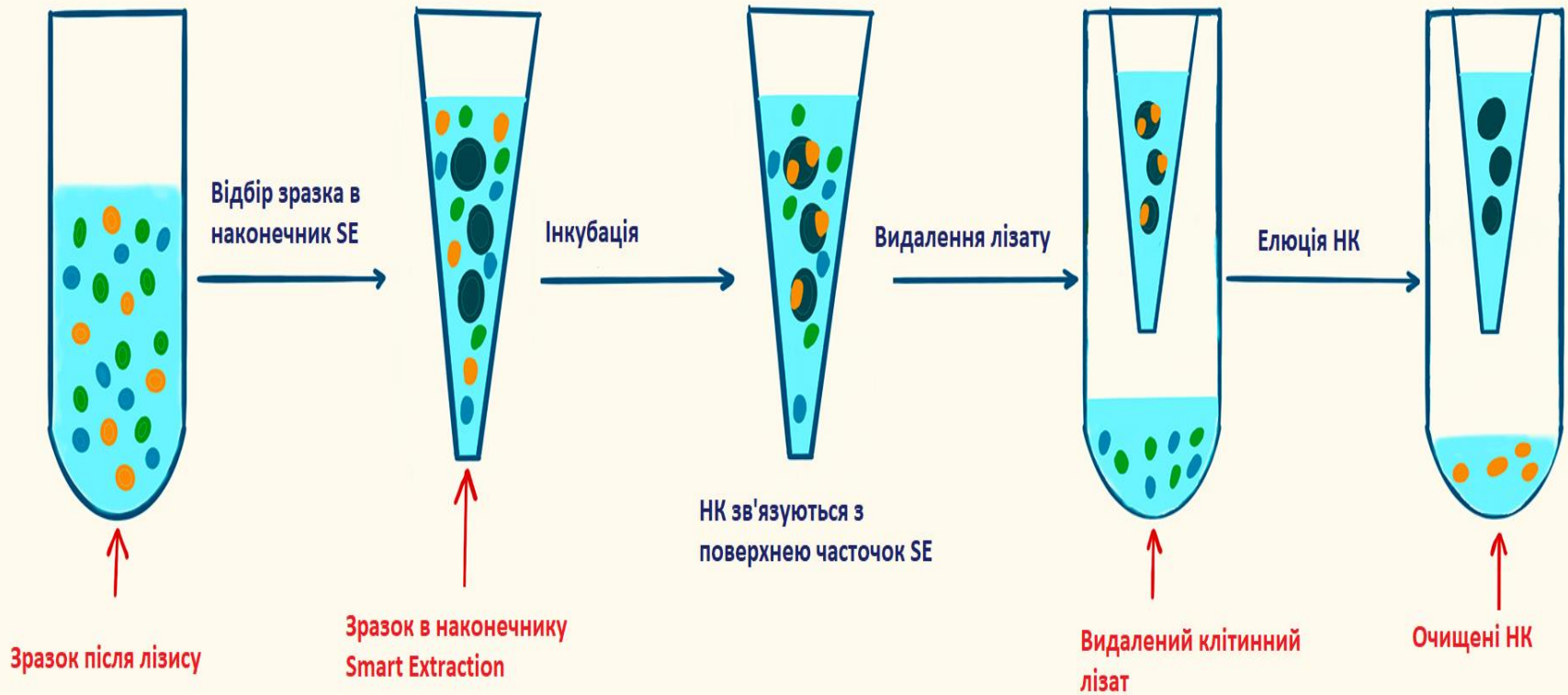
Магнітні частки



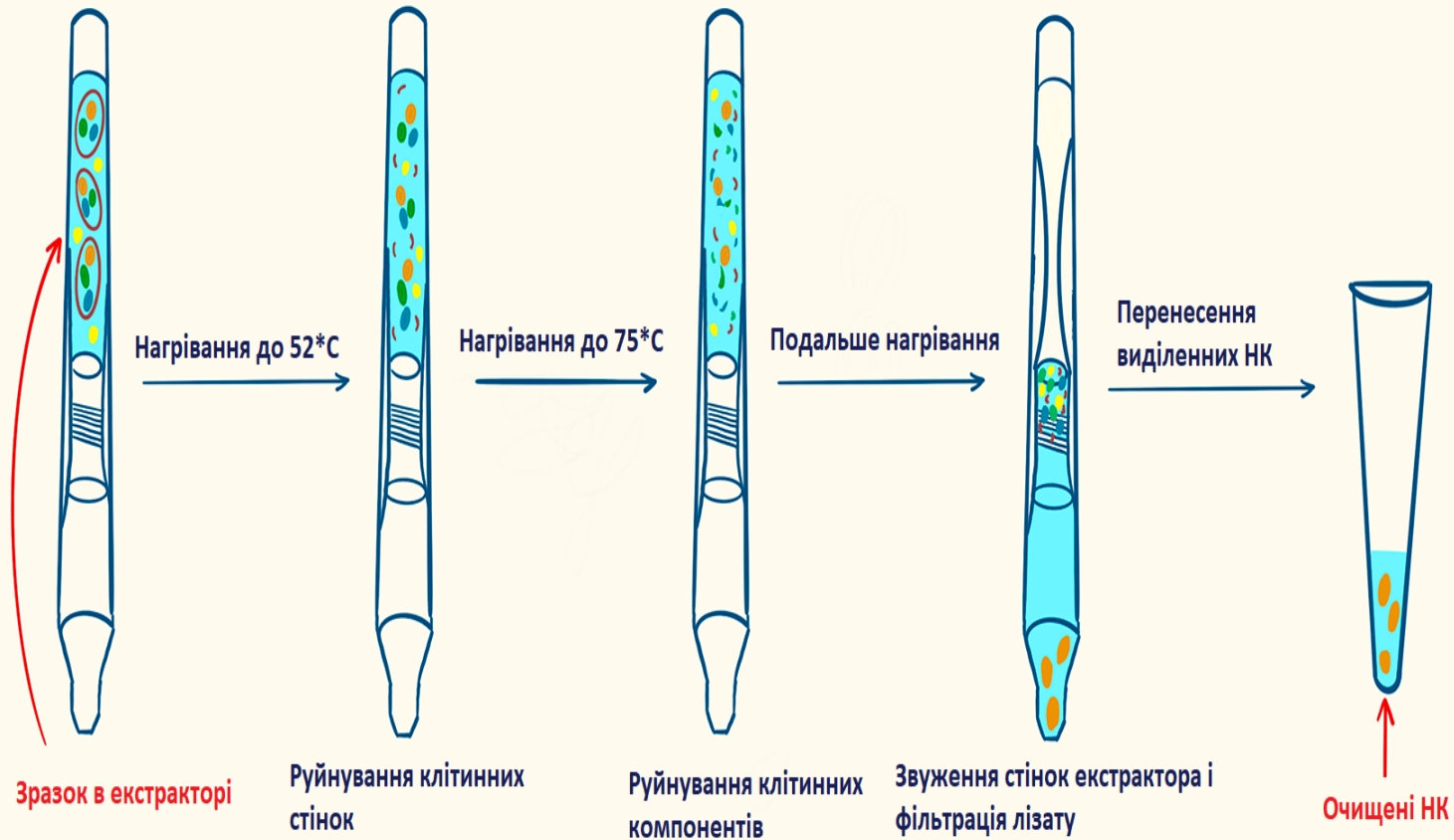
Використання скляних бусин для преципітації



Smart Extraction

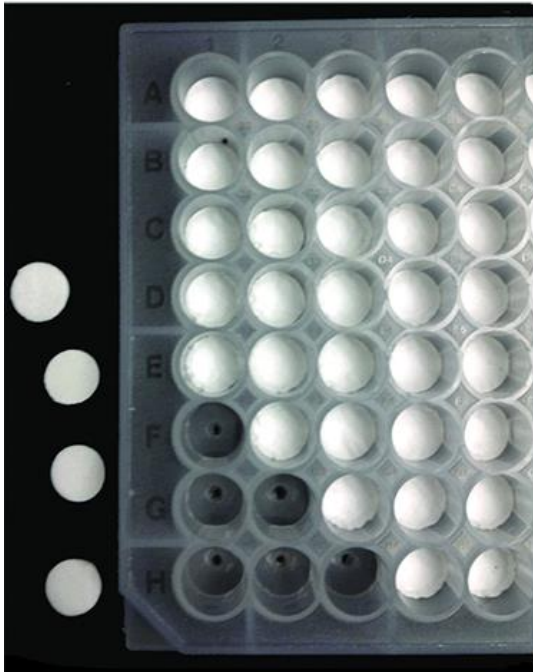


Ферментативна температуро-залежна екстракція

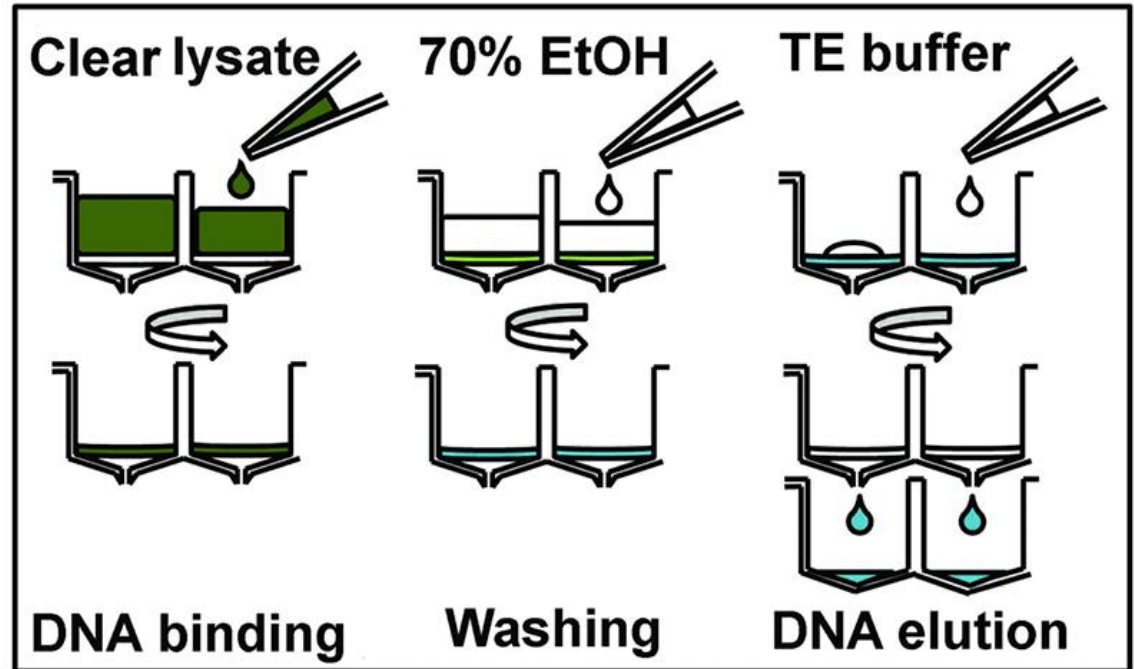


Використання фільтрувального паперу

а



б



Складні методи екстракції

Сорбція

лізис

Сорбція на різноманітних носіях (силикагель / магнітні частки / спінолонки)

відмивання

елюція

Преципітація

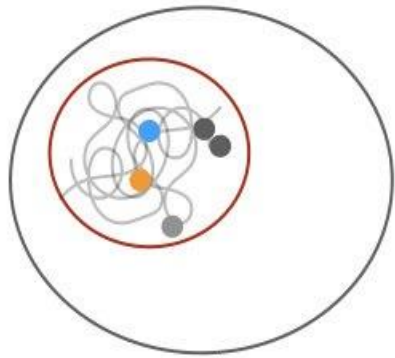
лізис

Осадження ізопропанолом

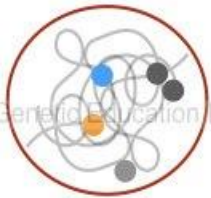
відмивання

елюція

Преципітація ДНК



Лізис клітинної стінки / мембрани



© Genetic Education Inc.

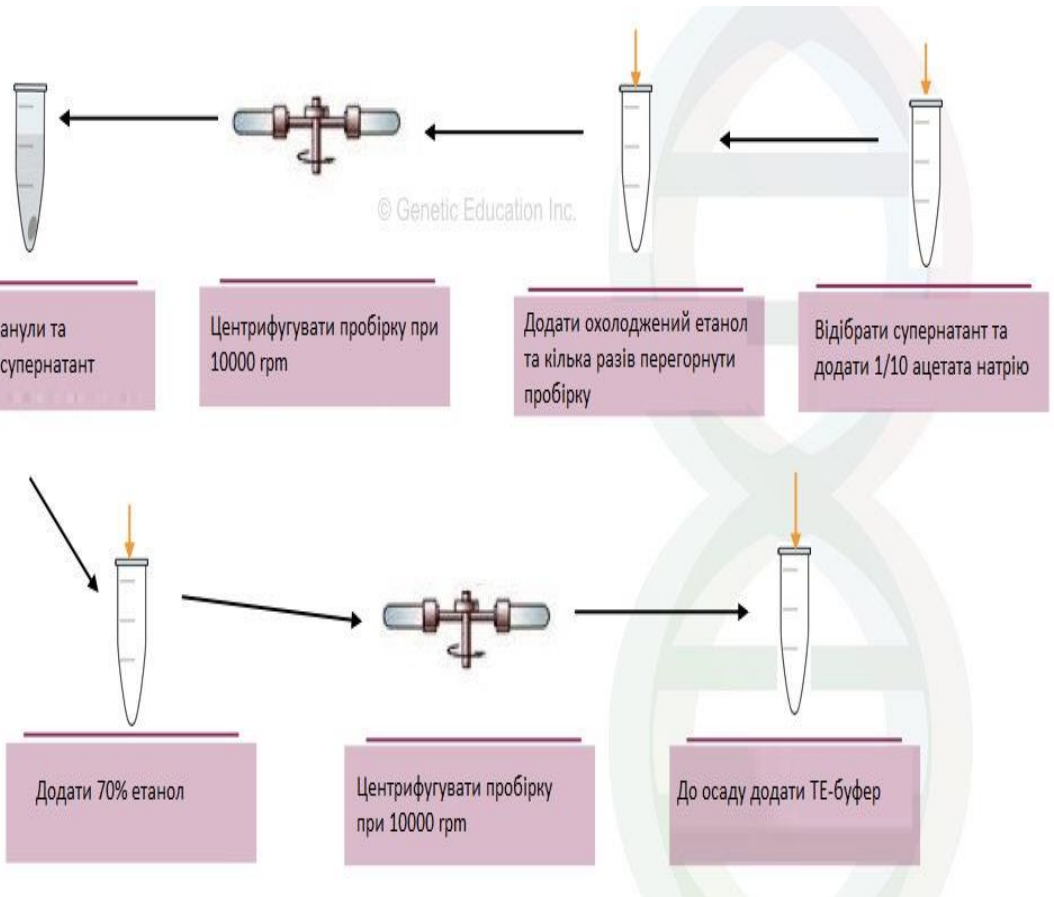
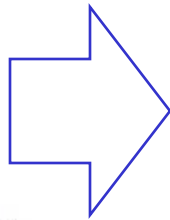
Лізис ядерної мембрани



Преципітація (осадження) ДНК



Очищення ДНК



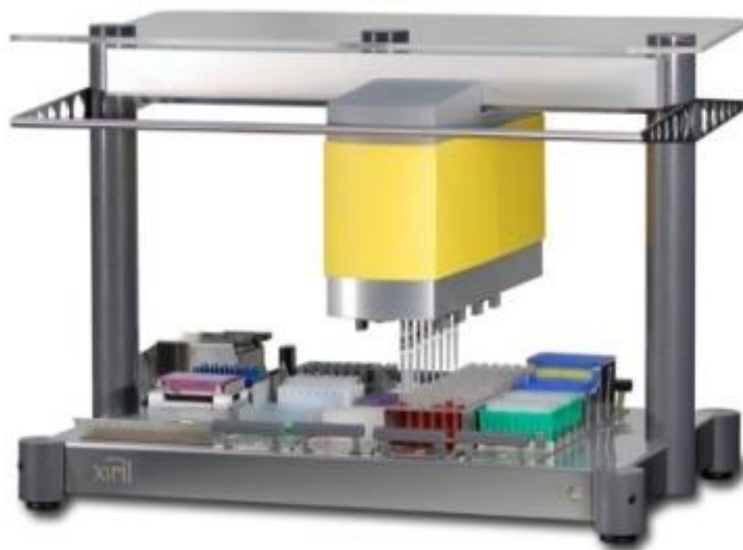
Порівняння основних методів екстракції нуклеїнових кислот.

Метод екстракції	Біоматеріал	Переваги методу	Недоліки
Хроматографія SEC	Будь-який	Простий у використанні, відносно швидкий	Порівняльно невисокий вихід та якість НК. Не може ефективно відділяти ДНК від РНК
Хроматографія IEC	Будь-який	Простий у використанні, відносно швидкий. Добре відділяє ДНК від РНК	Порівняльно невисокий вихід та якість НК.
Центрифугування + EtBr-CsCl	Будь-який	Може ефективно ізолювати плазмідни, а також геномну ДНК	Токсичні реагенти, дорогий, трудомісткий. Чистота і вихід НК відносно невеликі.
Лужна екстракція	Бажано - бактерії	Краще для виділення плазмідної ДНК	Контамінація вихідного розчину хромосомною ДНК
Спін-колонки	Будь-який	Швидкий, простий, безпечний. Можна змінити фільтри і відділяти геномну ДНК від плазмідної або РНК.	Дорогий, відносно невисокий вихід НК
Висолювання	Кров, культура клітин, гомогенат	Бюджетний, безпечні реагенти	Може займати багато часу
СТАВ	Рослини	Ефективний метод для роботи з рослинними тканинами, що містять поліфеноли.	Трудомісткий метод, можлива комбінація з іншими підходами з використанням токсичних реагентів
Ферменти	Будь-який	Простий, безпечний, дає високу якість і вихід НК	Дорогі витратні матеріали, іноді вимагає тривалої інкубації
Фенол-хлороформ	Будь-який	Дає високу якість і вихід НК	Токсичні реагенти, тривалість
Магнітні частки	Будь-який	Простий, швидкий, точний, безпечний	Потребує наявності автоматичного екстрактора та його налаштування, або наявності магнітного штативу
Скляні бусини	Будь-який	Можна комбінувати з нетоксичними буферами, гарний вихід НК	Забруднення фінального елюата бусинами
<i>Chelex-100</i>	Будь-який	Швидкий, економічний, безпечний	Не видаляє домішки достатньо для подальшого використання з іншими методиками
<i>SmartExtraction</i>	Будь-який	Не має необхідності в великій кількості обладнання, не токсичний, гарний вихід НК.	
Ферментативна температурозалежна	Будь-який	Швидкий, недорогий	Для невеликого об'єму зразка
Фільтрувальний папір	Будь-який	Економічний, простий, безпечний, гарний вихід НК	Не працює з малими об'ємами



Готові рішення Xiril

Платформа для виділення нуклеїнових кислот



Neon 100-1-8

Платформа для приготування пулів



Neon 100-1-4

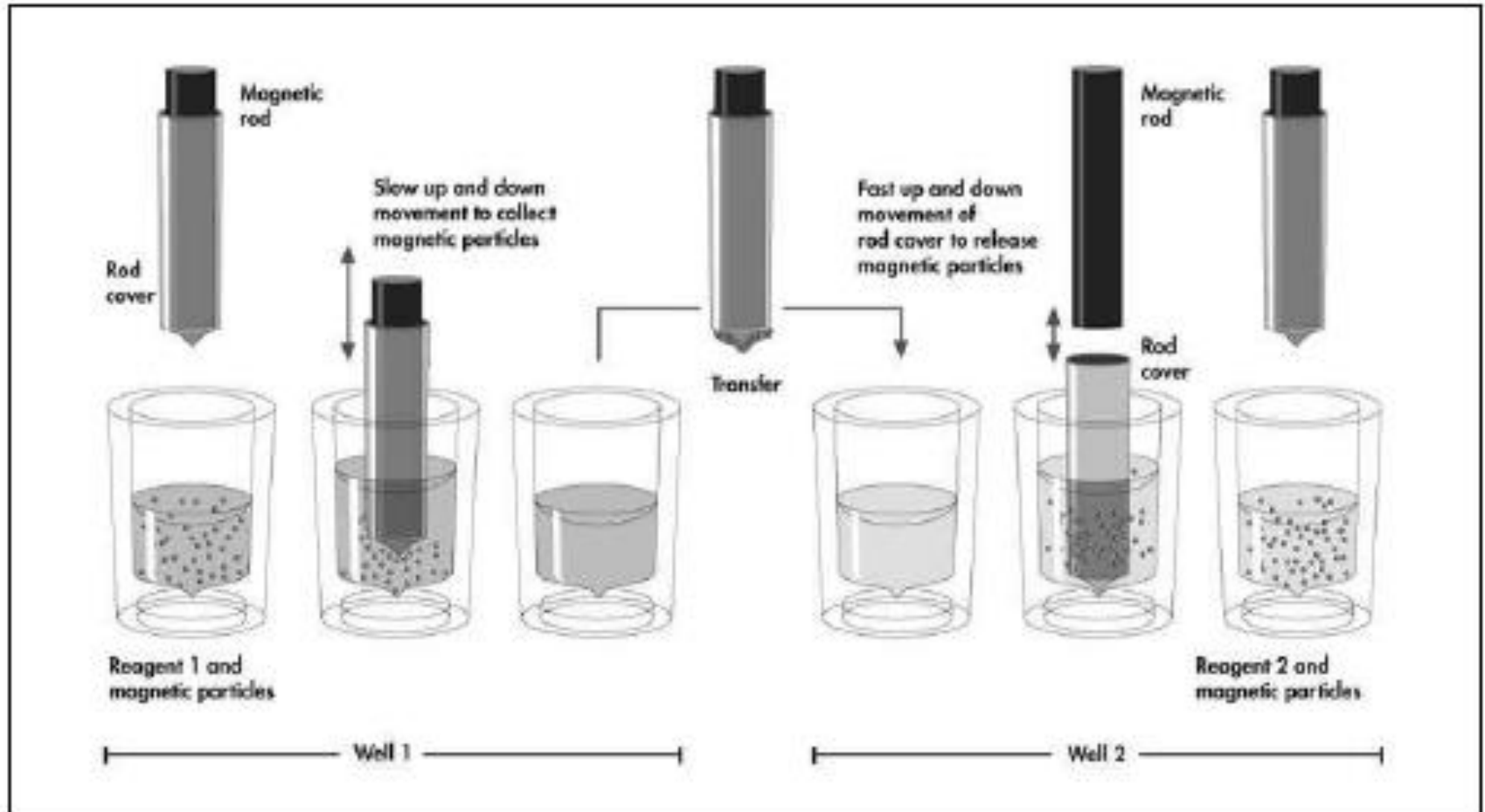
QIAasymphony

Станція екстракції ДНК/РНК
QIAasymphony SP

Повний автомат для виділення
ДНК/РНК и постановки ПЦР
QIAasymphony модулі SP та AS



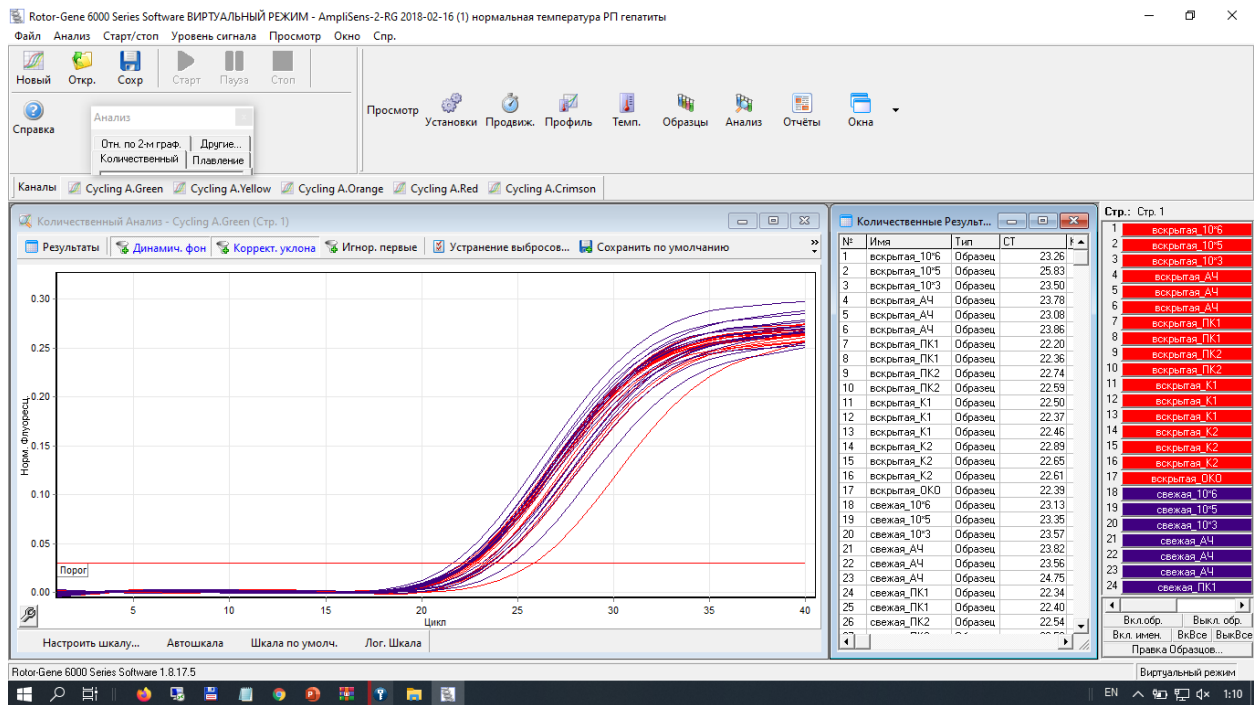
Принцип екстракції



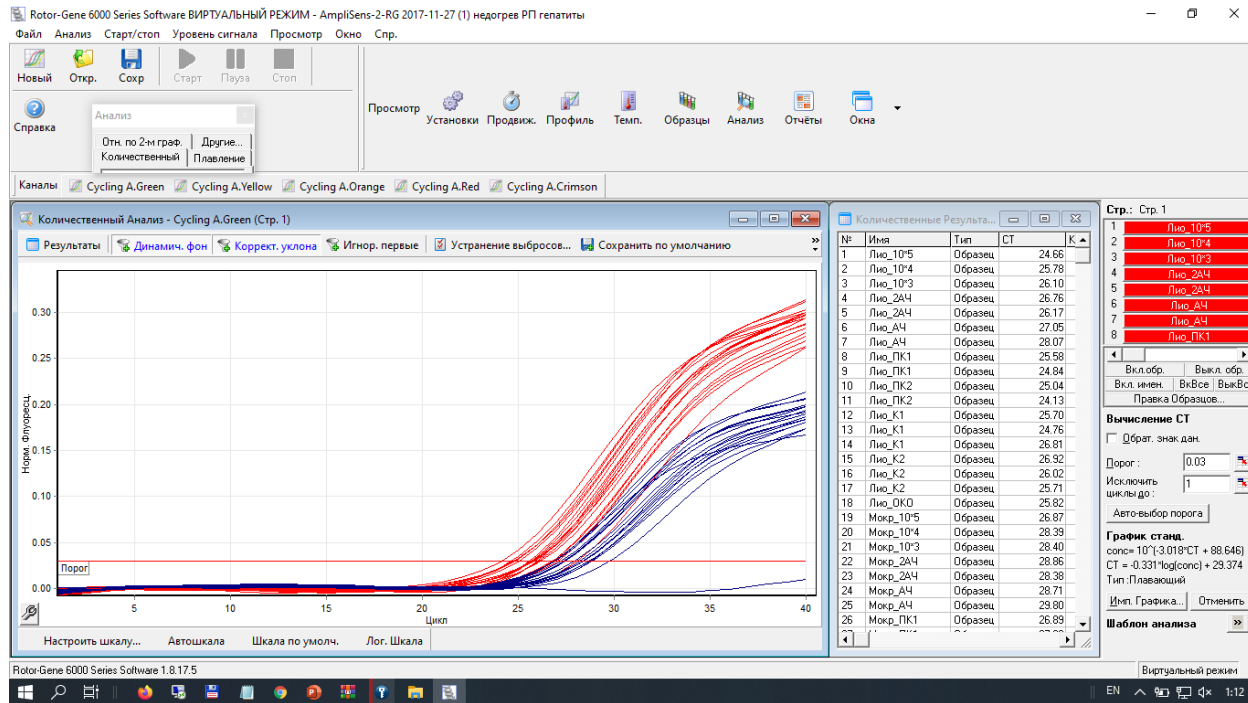
Тонкі місця методики екстракції

- Температура лізису, сушіння, елюції
- Ступінь просихання сорбенту
- Відновлення ліофілізату
- Порядок внесення протеїнази
- Зберігання попередньо розлитих реагентів (суміші сорбенту + лізуючого розчину)
- Тривалість протоколу екстракції (кількість відмивок)
- Умови зберігання та експлуатації реагентів та зразків (температура в приміщенні),
- Помилки при маркуванні та внесенні зразків,
- Піпетування (перший та другий упор, внесення малих обсягів (крапелька на наконечнику), обсяг наконечників)
- Вортексування та перемішування
- Переплутування реагентів (*напр., лізуючий розчин з «Рібо-преп» та «Рібо-сорб»*) ...

Вплив температури екстракції на результати. Температура екстракції згідно з інструкцією (65°C)

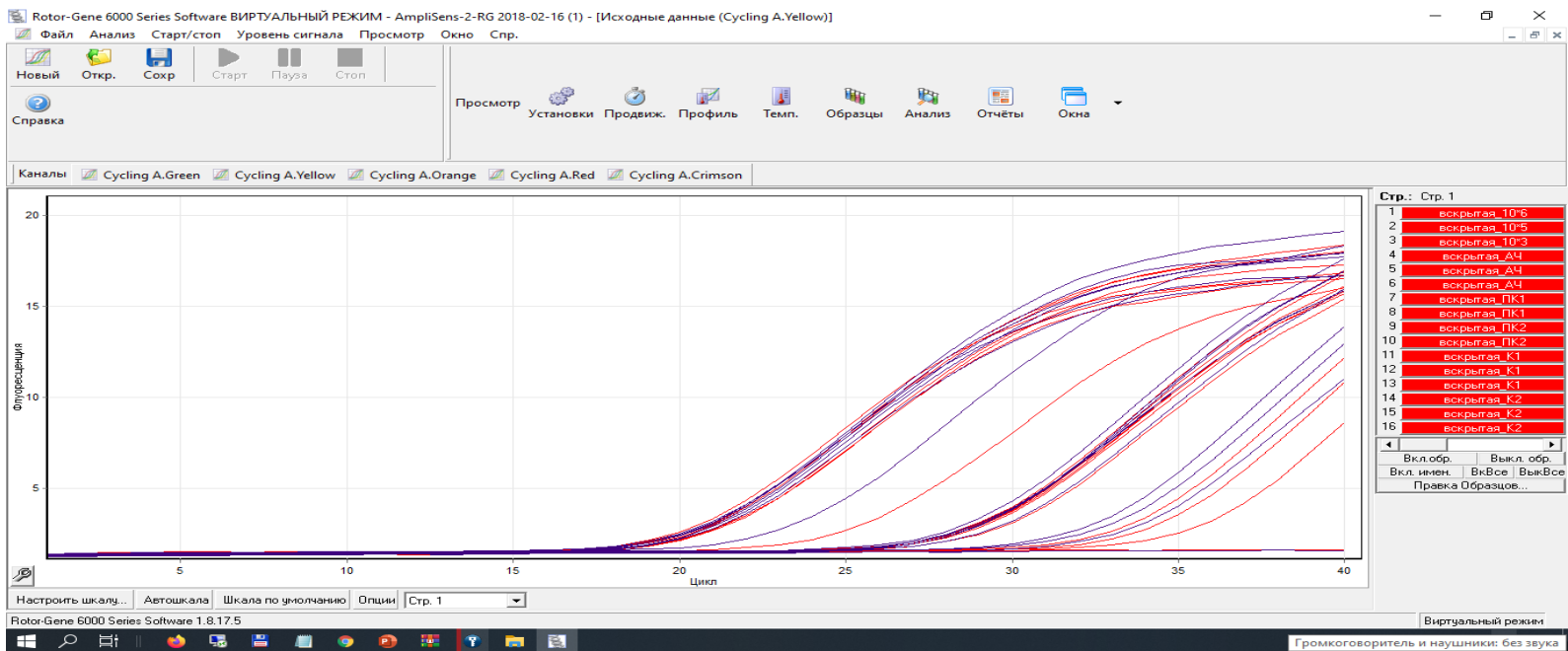


Недогрівання. Температура лізису та елюції 60*С

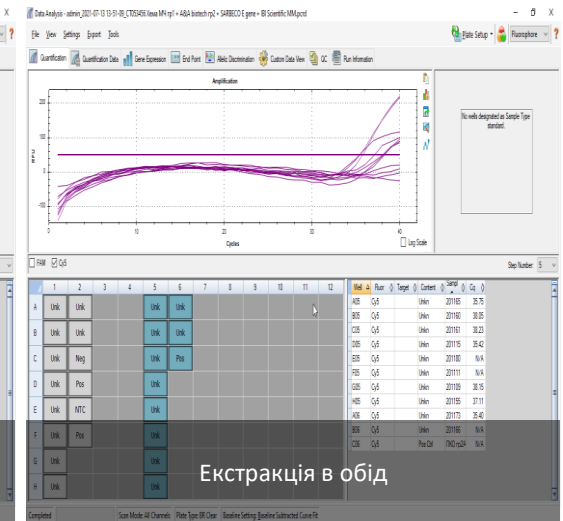
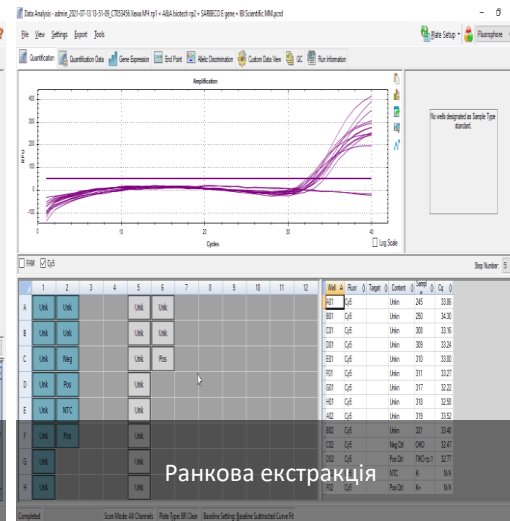
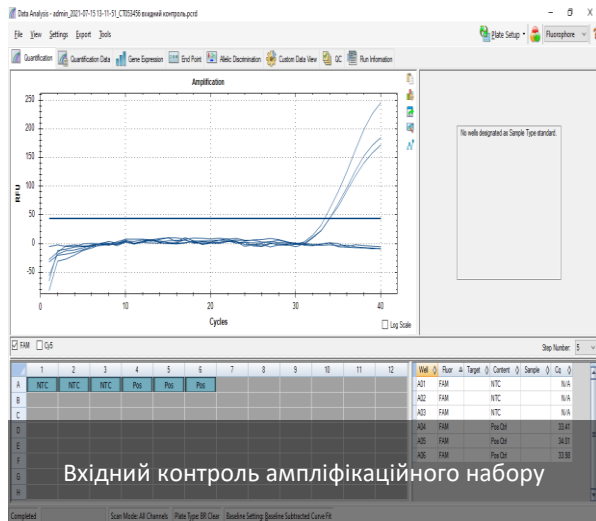


Ліофілізований ВКО: розчинність при відновленні

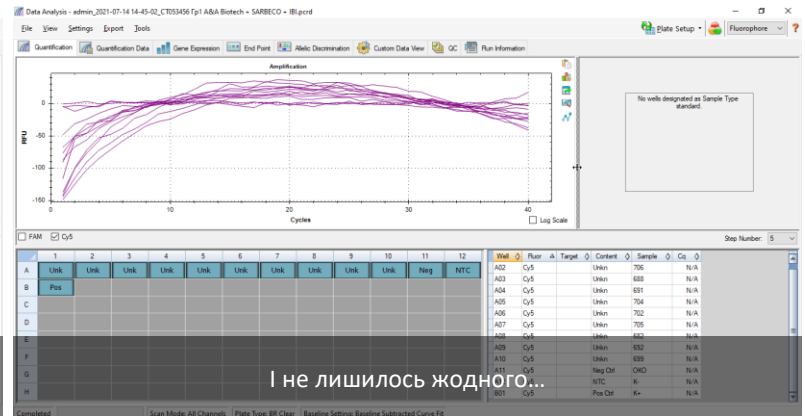
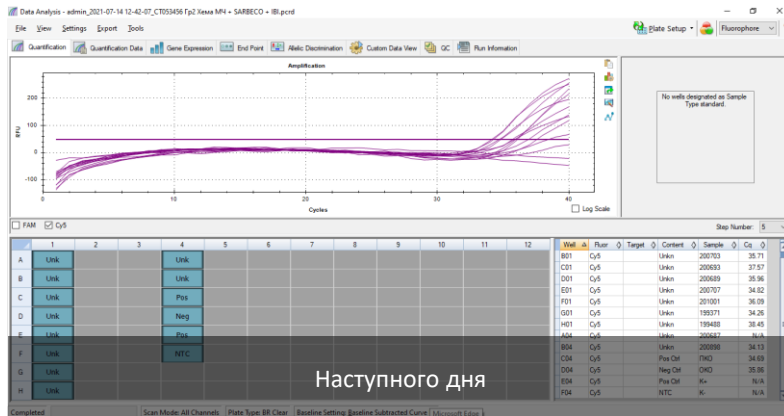
Растворитель	Образец	Ct FAM								Ct HEX			
		Дата восстановления ВКО								Дата восстановления ВКО			
		14.фев	ВКО медiana	15.фев	ВКО медiana	16.02 (утро)	ВКО медiana	16.02 (вечер)	ВКО медiana	14.фев	15.фев	16.02 (утро)	16.02 (вечер)
Плазма	10*4	21,8	22,1	21,9	22,1	25,1	25,1	25,6	26	26,8	27	27	27,2
	10*3	22,4		22,1		25,3		26,5		31,7	30,6	30,5	31,2
	10*3	22,1	22,1	22,1	24,7	26	30,1	31,1	30,2	31,6			
ОКО	ОКО	20,1	20,2	20,3	20,3	23,6	23,85	23,5	23,5				
	ПКО1	20,3			24,1	23,5		21,7		22,2	21,7		
	ПКО2					23,9			31,7				
	K1					23,4	23,5			21,8			
	K2							31,4					



Вплив температури в приміщенні



Вплив температури в приміщенні



Реагенти, витратні матеріали, обладнання

1. Обладнання:

- Температура термостатів та нагрівальних блоків станцій
- Контамінація станцій, ШББ
- Перебої електромережі, розморожування холодильників

2. Реагенти:

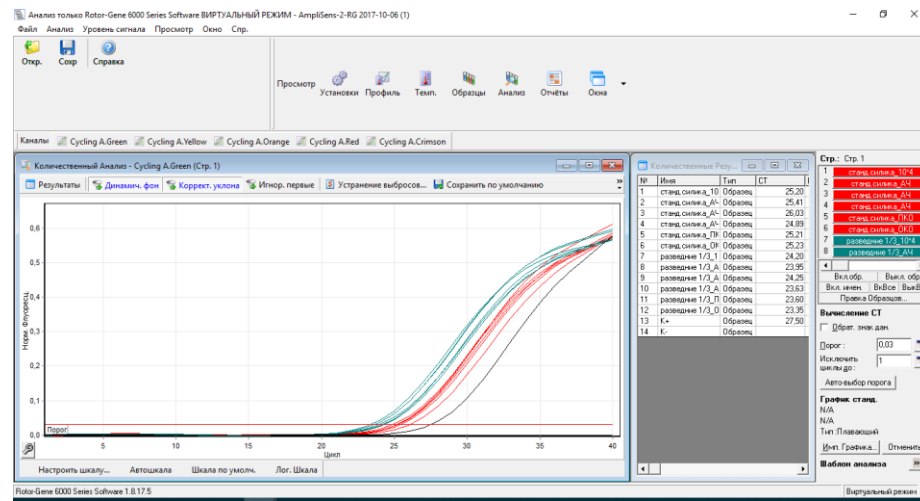
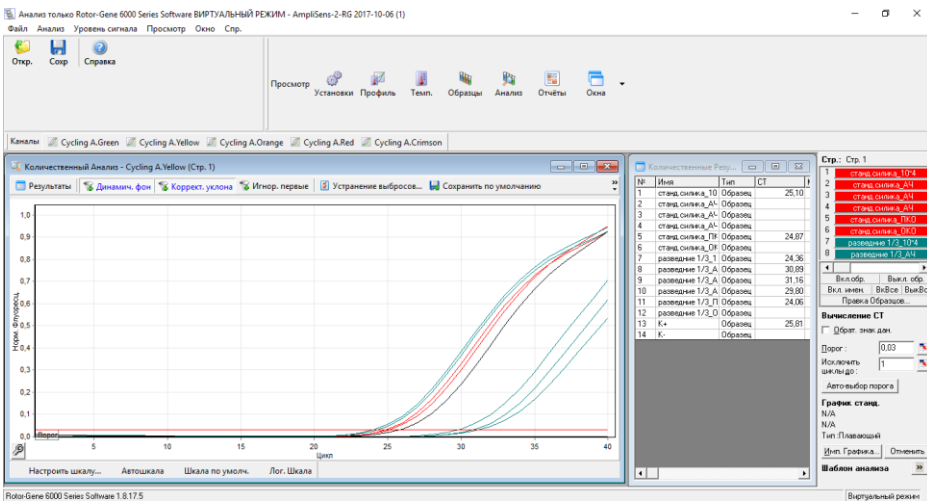
- Зміна постачальника складових у виробника (сорбент),
- Заміна параметрів набору без інформування клієнта + невміння читати вказівки.

3. Витратні матеріали:

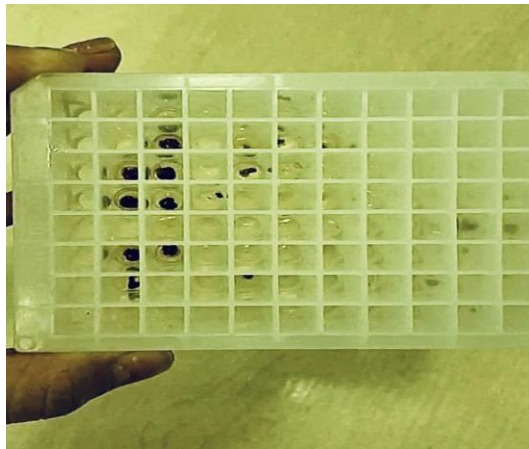
- Несумісний з обладнанням або неякісний пластик (деградація РНК, силіка залишається в лунках, застрягання плашок у приладі, поломка приладів)

Заміна постачальника магнітної сіліки у виробника наборів для екстракції

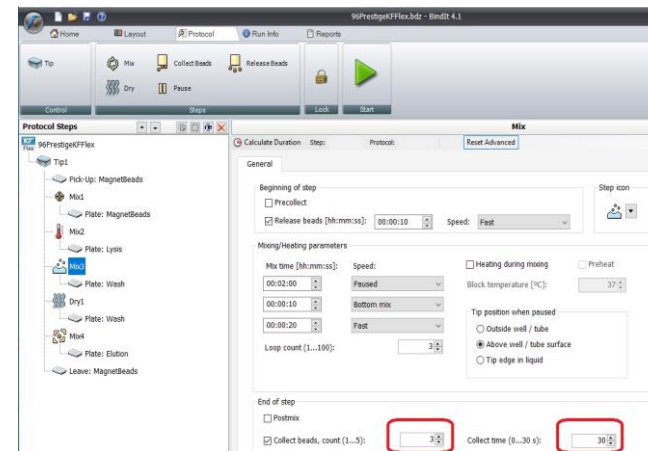
Зразок	FAM / IC	Сред. Ct	HEX	Сред. Ct
станд.сіліка_10*4	25,2	25,33	25,1	25,1
станд.сіліка_АЧ	25,41			
станд.сіліка_АЧ	26,03			
станд.сіліка_АЧ	24,89			
станд.сіліка_ПКО	25,21		24,87	24,87
станд.сіліка_ОКО	25,23			
розведення 1/3_10*4	24,2	23,83	24,36	24,36
розведення 1/3_АЧ	23,95		30,89	30,62
розведення 1/3_АЧ	24,25		31,16	
розведення 1/3_АЧ	23,63		29,8	
розведення 1/3_ПКО	23,6		24,06	
розведення 1/3_ОКО	23,35			
К+	27,5		25,81	25,81
К-				



Магнітний сорбент в лунках DWP



- **Можлива причина:**
- Неякісний пластик
- Неякісна магнітна силіка
- Проблема з магнітом платформи екстракції



Що робити:

- Замінити пластик \ реанти
- Збільшити час \ силу магнетизації в протоколі екстракції
- Викликати сервісного інженера

Контролі ПЛР

ПЛР – прямий метод визначення мікроорганізмів.

- Залежить від локалізації мікроорганізму – використовується будь-який доступний біологічний матеріал;
- Ферментативний процес - чутливий до впливу інгібіторів ЗТ, ПЛР;

ПЛР-аналіз – багатостадійний процес

Етап відбору біоматеріалу, транспортування, попередньої обробки

Етап екстракції (виділення) нуклеїнових кислот

Етап зворотної транскрипції (для РНК)

Етап власне ПЛР, детекції результатів ПЛР

Внутрішній контрольний зразок ПЛР-аналізу (ВКЗ) – це препарат ДНК/РНК, доданий до кожного досліджуваного зразка на етапі обробки біологічного матеріалу, який проходить через усі стадії ПЛР-аналізу – екстракція НК, ЗТ, ПЛР, на етапі детекції результат ампліфікації ВКЗ дозволяє судити про якість проведення ПЛР-аналізу загалом, а не окремих його етапів.

Класифікація ВКЗ

- РНК-контролі або ДНК-контролі

РНК і ДНК -контролі

Мішень

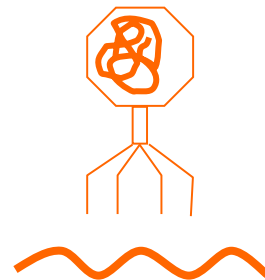
Контроль

ДНК вірусів,
бактерій



ДНК, упакована у фаг Лямбда
або ендогенний фрагмент
геномної ДНК людини

РНК вірусів, мРНК бактерій



РНК, упакована в MS2 фаг
або ендогенна мРНК людини

Класифікація ВКЗ

- РНК-контролі або ДНК-контролі
- Захищені або незахищені

Класифікація ВКЗ

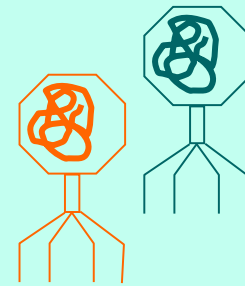
- РНК-контролі або ДНК-контролі
- Захищені або незахищені
- Ендогенні чи екзогенні

Ендогенні та екзогенні контролі

- Знаходиться в клінічному матеріалі
- Є фрагментом ДНК/РНК людини
- Показує якість відбору, зберігання біологічного матеріалу та етапу виділення НК
- Кількість не стандартизована



- Додається до досліджуваного матеріалу
- Сконструйований штучно
- Показує якість етапу виділення
- Кількісно охарактеризований

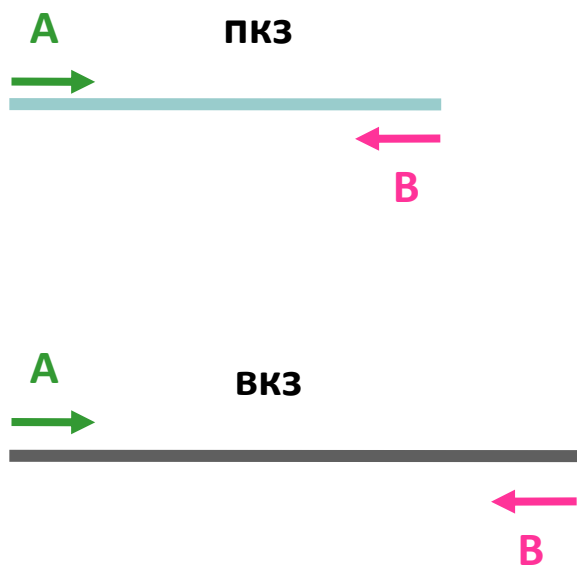


Класифікація ВКЗ

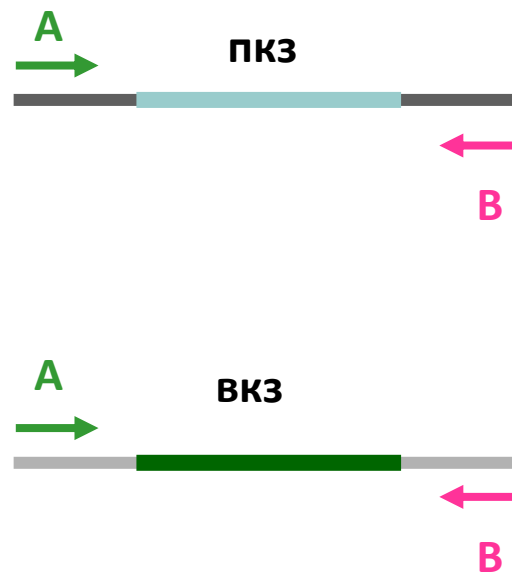
- РНК-контролі або ДНК-контролі
- Захищені або незахищені
- Ендогенні чи екзогенні
- Конкурентні або неконкурентні

Конкурентний ВКЗ

Електрофоретична детекція



Флуоресцентна детекція



Неконкурентный ВКЗ



Класифікація ВКЗ

- РНК-контролі або ДНК-контролі
- Захищені або незахищені
- Ендогенні чи екзогенні
- Конкурентні або неконкурентні
- Для електрофоретичної детекції або для флуоресцентної детекції

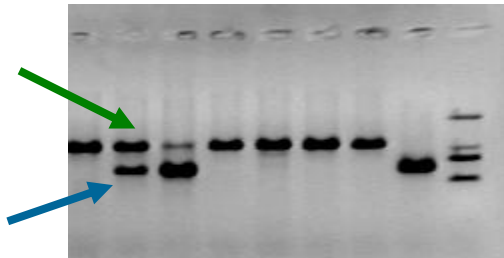
ВКЗ для ЕФ та флуоресцентних методів

Електрофоретична
детекція

ПКЗ

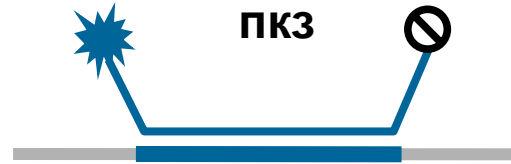


ВКЗ

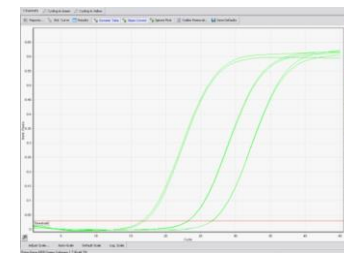
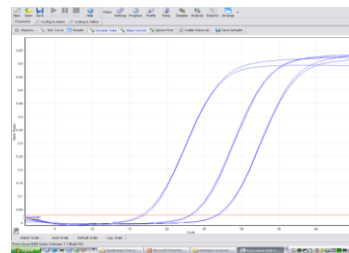


Флуоресцентна
детекція

ПКЗ



ВКЗ





Контроль **якості відбору та збереження** біологічного матеріалу (**ендогенний**)

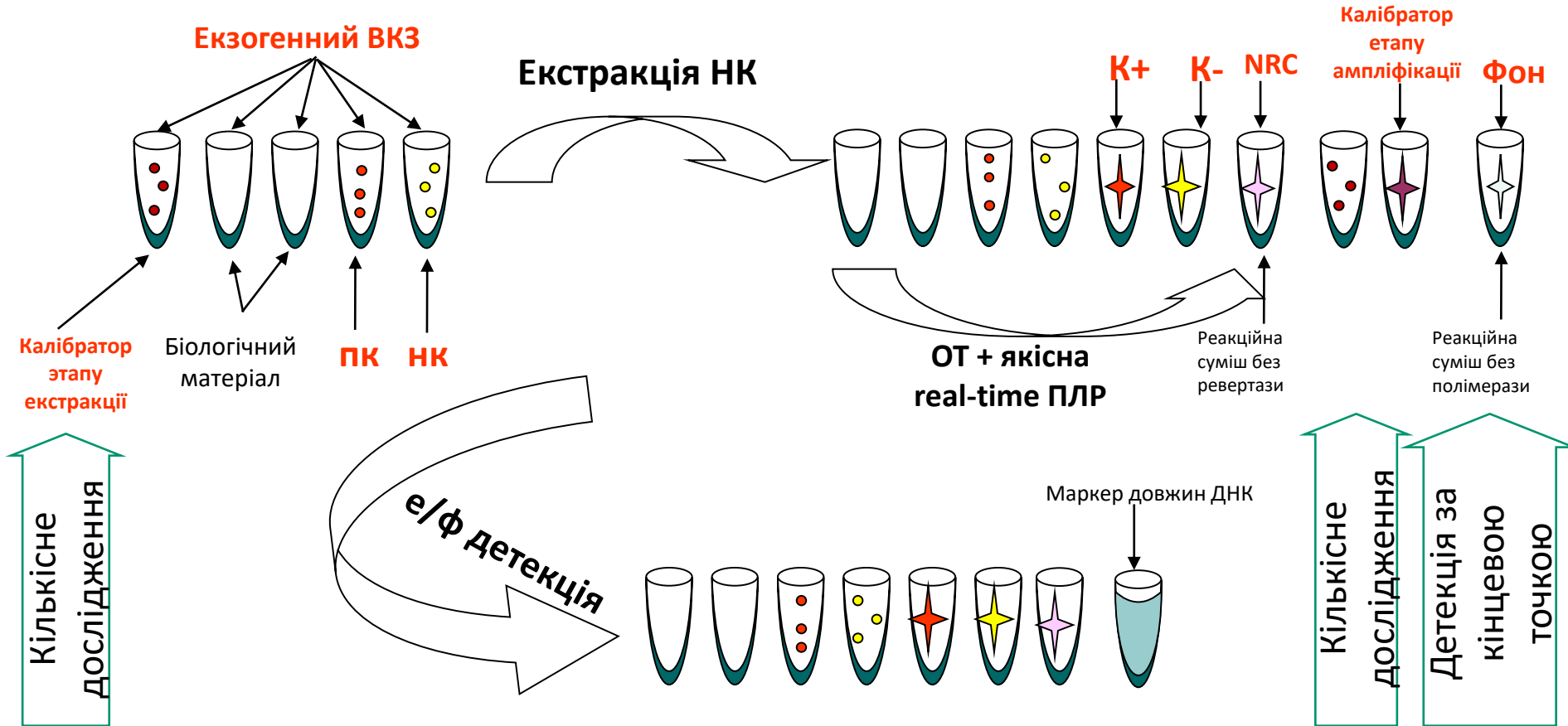


Контроль **втрат ДНК/РНК** під час екстракції НК та **ефективності видалення інгібіторів** ЗТ та ПЛР (**екзогенний**)



Контроль за роботою лабораторного **персоналу**

Варіанти постановки контрольних зразків



Інтерпретація результатів контролей



ВКЗ – що ми оцінюємо?

Граничні значення C_t у зразках та контролю, відповідно до інструкції.

Якщо $C_t \text{ ВКЗ} \geq \text{граничного}$, зразок невалідний (за відсутності сигналу від специфічної мішені). Перестановка або перезабір.

Причини невалідного результату ВКОЗ (Ст ВКЗ \geq граничного або не визначено)

Неадекватний відбір, зберігання, транспортування зразка (ендогенний ВКЗ: недостатня кількість клітин людини у зразку/деградація ПК). **Повторна екстракція не допоможе. Необхідний перезабір.**

Помилки лаборантів у методиці екстракції (екзогенний ВКЗ: втрати НК ВКЗ та мішені в ході екстракції). **Повторна екстракція буде ефективною при усуненні помилок лаборанта.**

Недостатнє відновлення ВКЗ (у разі використання ліофілізованого препарату). **Повторна екстракція буде ефективна при дотриманні температури та часу відновлення ліофілізату.**

Недотримання умов зберігання \ експлуатації реагентів (особливо для РНК-екзогенного ВКЗ). **Повторна екстракція допоможе після заміни реагентів**

Похибки піпетування/помилка людського фактора (не внесли ВКЗ). **Повторна екстракція буде ефективна при усуненні помилок під час піпетування.**

Несправність або зниження ефективності роботи нагрівальних елементів обладнання. **Повторна екстракція неефективна до усунення поломки (або, якщо вийшов з ладу лише один елемент Пельтьє з кількох - при постановці проби в іншу лунку плашки ампліфікатора)**

Наявність інгібіторів у зразку. **Повторна екстракція може бути ефективною при заміні оптимізації методики екстракції або видаленні інгібіторів (розведення зразка одноразове заморожування або прогрів використання енхансерів і т.д.). В іншому випадку рекомендовано перезабір.**

Еефективна ЗТ (для РНК-мішеней). **Повторна екстракція потрібна. Також слід з'ясувати та усунути причину неадекватної ЗТ (або замінити реагенти для ЗТ).**

Помилки лаборанта на етапі ампліфікації (похибки піпетування при приготуванні реакційних сумішей, використання неадекватного обсягу наконечників, недотримання умов зберігання та експлуатації ампліфікаційних наборів тощо). **При помилках, що повторюються, повторна екстракція буде неефективна.**

Інтенсивне фонове світіння пластику \ лунок ампліфікатора, що маскує сигнали ВКЗ. **Необхідне проведення вхідного контролю пластику. Необхідна заміна пластику та чищення лунок ампліфікатора.**

Неякісні набори реагентів на вході – бракована серія, порушення умов зберігання та транспортування наборів реагентів постачальником тощо. **Необхідний вхідний контроль реагентів. Необхідна заміна реагентів.**

ВКЗ – що потрібно оцінювати?

1. Граничні значення Ct у зразках та контролю, відповідно до інструкції.
 - Якщо Ct ВКЗ \geq граничного, зразок невалідний (за відсутності сигналу від специфічної мішені). Перестановка або перезабір.
 2. Середнє значення Ct ВКЗ для зразків у межах однієї постановки та розкид значень Ct ВКЗ щодо середнього (для екзогенного ВКЗ!). АЛЕ! Немає рекомендацій щодо нормального значення розкиду Ct ВКЗ.
 - Допустиме середнє та допустимий розкид значень Ct ВКО визначаємо під час валідації методики. Для цього розраховуємо середнє арифметичне, коефіцієнт варіації та стандартне відхилення.
 - Можна скористатися правилом двох сигм.
 - Або прийняти допустиме стандартне відхилення під час тестування повторностей аналіту за умов повторюваності (зазвичай 5-10%).
 3. Зсув середнього значення Ct ВКЗ праворуч від постановки до постановки в межах серії.
 4. Форму кривих ВКЗ: розгорання
-

ВКЗ - про що говорять ці параметри?

Граничні значення C_t у зразках та контролю, відповідно до інструкції.

- Якщо C_t ендogenous ВКЗ \geq граничного в окремих випадково розташованих зразках – похибка преаналітичного етапу. Необхідний перезабір.
 - Якщо C_t екзогенного ВКЗ \geq граничного в окремих випадково розташованих зразках – порушення етапу екстракції або наявність інгібіторів у зразках. Необхідний контроль за роботою лаборанта або дії з інактивації інгібіторів.
 - Якщо C_t екзогенного ВКЗ \geq граничного у групі зразків, розташованих у певній (повторюваній) позиції у плашці – необхідно перевірити роботу нагрівальних елементів обладнання. Можливий вихід із ладу елемента Пельтьє
-

ВКЗ - про що говорять ці параметри?

Середнє значення C_t ВКЗ для зразків у межах однієї постановки завищено (зрушено праворуч). Розкид значень C_t ВКЗ щодо середнього (коефіцієнт варіації) збільшено

- Зниження ефективності екстракції через помилки лаборанта у методиці. Необхідний контроль за роботою лаборанта
 - Зниження ефективності роботи нагрівальних елементів обладнання. Необхідний виклик сервісного інженера.
 - Зниження якості набору реагентів (для екстракції та для ампліфікації). Необхідний вхідний контроль серії наборів. Необхідна оцінка функціональності набору реагентів, заміна за необхідності та оформлення рекламації.
-

ВКЗ - про що говорять ці параметри?

Сзсув середнього значення Ct ВКЗ вправо (поступове збільшення середнього значення Ct ВКО) від постановки до постановки в межах серії

- Зниження ефективності роботи нагрівальних елементів обладнання. Необхідний виклик сервісного інженера.
- Зниження якості набору реагентів (для екстракції та для ампліфікації). Необхідний вхідний контроль серії наборів. Необхідна оцінка функціональності набору реагентів, заміна за необхідності та оформлення рекламачії.

Низьке розгорання, пологі ПЛР-криві

- Наявність інгібіторів у зразку. Необхідна оптимізація \ заміна методики екстракції або презабір
 - Можливе переплутування пробірок з буфером для полімерази (якщо використовуються кілька різних наборів від одного виробника зі схожим маркуванням)
-

Контроль етапу екстракції	Проблема	Можлива причина	Рішення
ПКЗ	Відсутній або слабкий специфічний сигнал/ВКЗ за наявності сигналу К+	Надмірні втрати НК при виділенні через порушення лаборантом методики екстракції.	Навчання лаборанта. Перевиділення зразка
		Надмірні втрати при екстракції через зниження ефективності роботи обладнання	Перевиділити ПКЗ з використанням іншого обладнання (якщо можливо)
		Зіпсувалися реактиви ПКЗ/ВКЗ (особливо якщо відзначається поступове зміщення St ПКЗ праворуч у межах серії)	Розвести ПКЗ та ВКЗ у 20 разів у ТЕ-буфері або воді, поставити ПЛР
		Неефективна ОТ (если ПКО – РНК)	Протестировать ПКО другой серии (развести в буфере, поставить в ПЦР вместе с К+)
НКЗ	відсутній сигнал ВКЗ (екзогенний)	аналогічно як для ПКЗ	аналогічно як для ПКО. А чи вносять лаборанти ВКЗ до НКЗ, якщо це передбачено методикою?
	наявність сигналу по каналу детекції специфічної мішені	контамінація	Заходи з деконтамінації. Перевиділення позитивних зразків (якнайменш)

Контроль етапу ампліфікації	Проблема	Можлива причина	Рішення
K+	Немає специфічної ПЛР-кривої або слабкий, пізній сигнал	Похибки піпетування \ помилка при приготуванні майстерміксу \ помилка при скапці контролю	Навчання лаборанту. Перестановка ПЛР (але не ЗТ-ПЛР!)
		Порушення режиму транспортування \ зберігання \ використання ампліфікаційних наборів. Інактивація ферментів. Деградація ДНК K+, деградація зондів\праймерів у складі реакційної суміші.	Вхідний контроль реагентів Навчання лаборантів. Заміна набору, рекламація (якщо можливо)
		Порушення роботи нагрівальних елементів ампліфікаційного обладнання	<ul style="list-style-type: none"> ○ Якщо K+ ставиться в ту саму лунку – скапати плашку K+. Так можна виявити, який із елементів Пельте вийшов з ладу. ○ Для деяких ампліфікаторів (Rotor Gene) є програмне забезпечення, що фіксує температуру термоблока в режимі реального часу ○ Іноді неефективність нагрівання охолодження термоблока викликана брудом у лунках або невідповідністю типу пробірок і термоблока (розмір, форма лунок, профіль пластику). Вибір відповідного пластику та періодичне чищення термоблока допоможе.
		Порушення роботи оптичної системи ампліфікатора	<ul style="list-style-type: none"> ○ Перевірити функціональність K+ на іншому приладі.
		Сильний фоновий сигнал від брудних лунок або пластику, що «фонить», маскує K+	Вхідний контроль пластику. Перевірка чистоти лунок за допомогою плашки «Фон» або опції зняття маски в ампліфікаторі ПЗ (для ДТ96). Періодичне чищення лунок ампліфікатора.
K-	Наявність специфічної ПЛР-кривої	контамінація	перестановка ПЛР, заходи щодо запобігання та деконтамінації

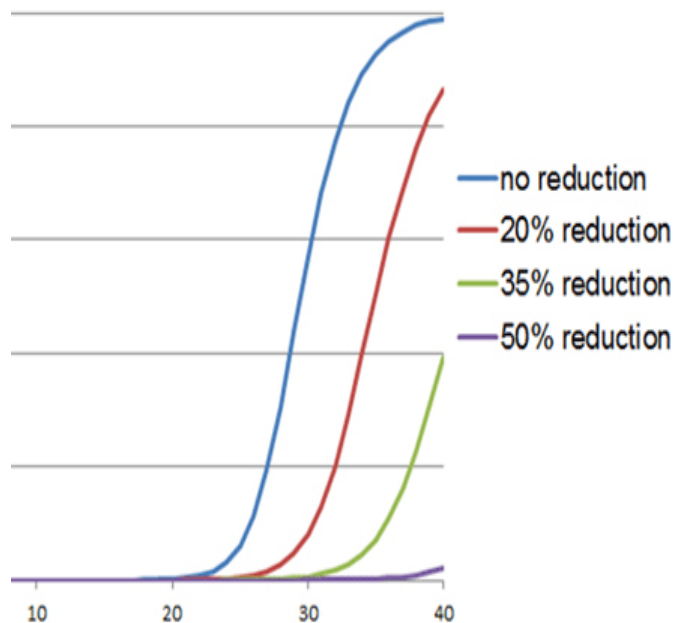
Як виявити інгібітори у зразках

Оцініть результати внутрішнього контролю (ВКЗ) у зразках та позитивного контролю екстракції (ПКЗ)

Виконайте спектрофотометрію, щоб визначити наявність інгібіторів

Виконайте ВЕРХ або МС

Як виявити інгібітори – контролі ПЛР



Якісна ПЛР

Інгібування Taq полімерази супроводжується збільшенням значення Ct (Cq) та зміною морфології кривої ампліфікації

- Порівняйте значення Ct (Cq) ВКЗ та ПКЗ
- Або: порівняйте зсув Ct (Cq) серійних розведень зразка

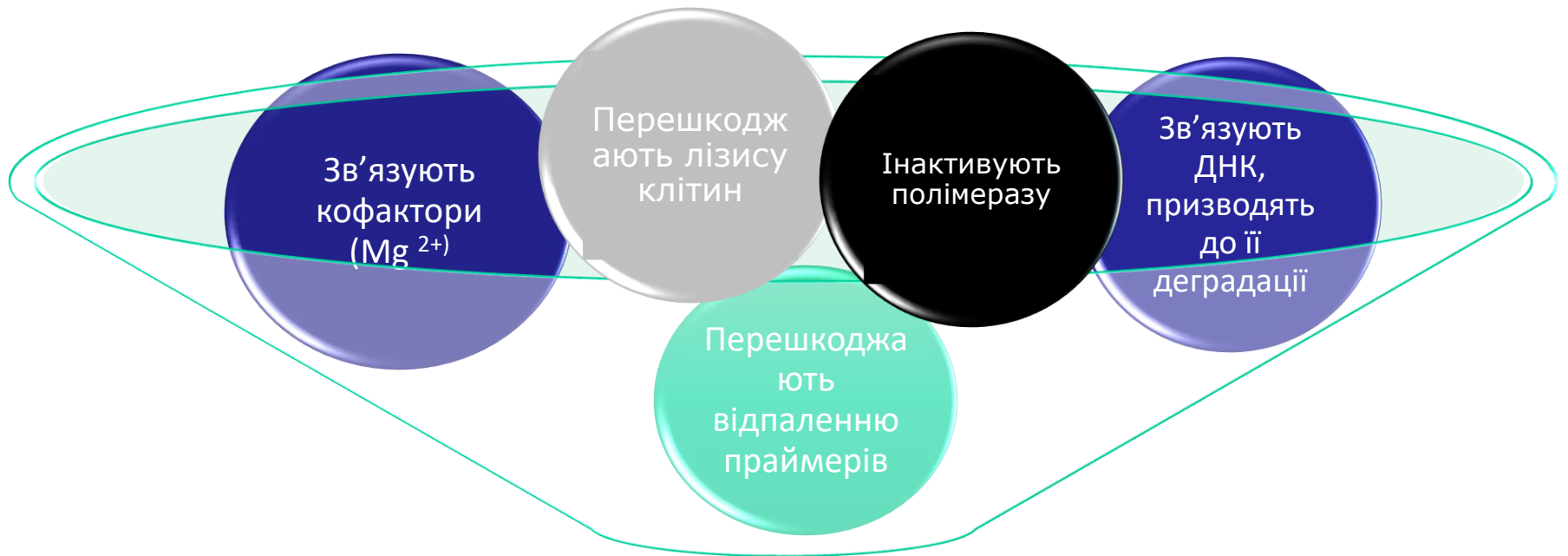
Інгібітори ПЛР

Лабільні

Ефект інгібування
нейтралізується
нагріванням,
заморожуванням-
розморожуванням,
зберіганням при +4С

Стабільні

Ефект інгібування
нейтралізується
розведенням зразків
або видаленням інгібіторів



Немає ампліфікації НК

Зниження чутливості тесту або хибно-негативні результати

Джерело інгібіторів

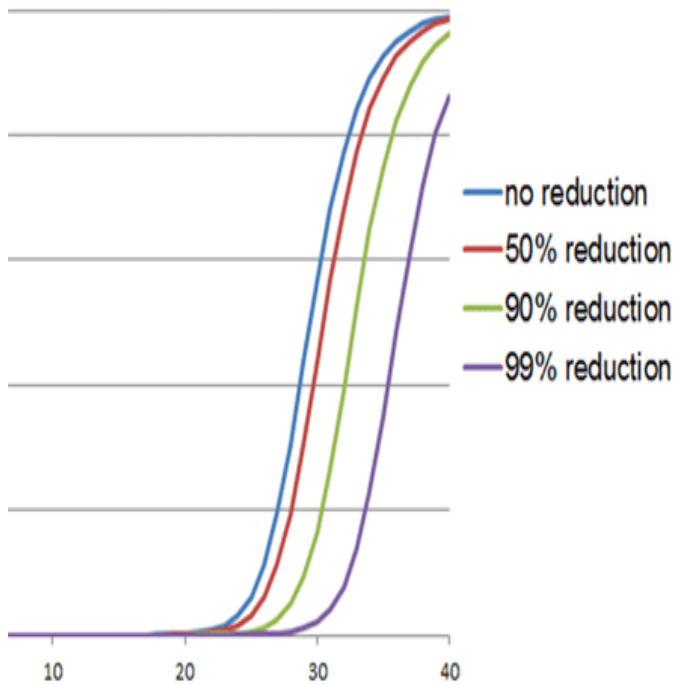
Матеріал зразка: *тканини* (дубільна кислота, меланін, міоглобін), *харчові продукти* (напр., колаген, протеази в молоці), *кров* (гепарин, гемоглобін, імуноглобуліни, лактоферин, білірубін, протеази, нуклеази, гормони, противірусні речовини), *фекалії* (солі жовчних кислот, складні полісахариди), *сеча* (солі сечовини), *середовище для культивування клітин*, *ґрунт* (гумінові речовини), *рослинний матеріал* (хлорофіл), *високомолекулярна геномна ДНК*,

Попередня обробка зразків: *хімічні речовини, що використовуються в процесах передобробки та екстракції* (напр., KCl, NaCl, іони кальцію, детергенти, такі як SDS, Tween-20, Triton-X-100, ксилол); **ваші нуклеази, колеги!**

Екстракція нуклеїнових кислот: деякі речовини, необхідні для відмивання в ході екстракції, діють як інгібітори, якщо їх не видалити або якщо вони присутні у високій концентрації (напр., додецилсульфат натрію (ДСН) у складі лізуючих буферів, етанол, ізопропанол натрію, хлороформ, детергенти). ЕДТА у складі ТЕ-буфера, який регулярно використовується для елюції та зберігання ДНК, інгібує ПЛР, пов'язуючи іони Mg²⁺.

Брудні витратні матеріали: порошок з одноразових рукавичок, нуклеази на пробірках та наконечниках.

Як виявити інгібітори – контролі ПЛР



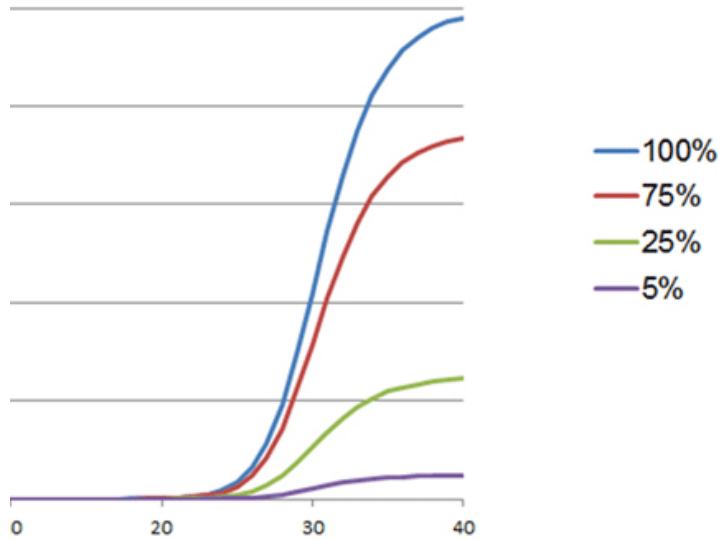
RT-qPCR

Інгібування зворотної транскриптази характеризується зрушенням значень Ct (Cq).

Крива ампліфікації виглядає нормально

- Порівняйте значення Ct (Cq) ВКО та ПКО
- Або: порівняйте зсув Ct (Cq) серійних розведень зразка

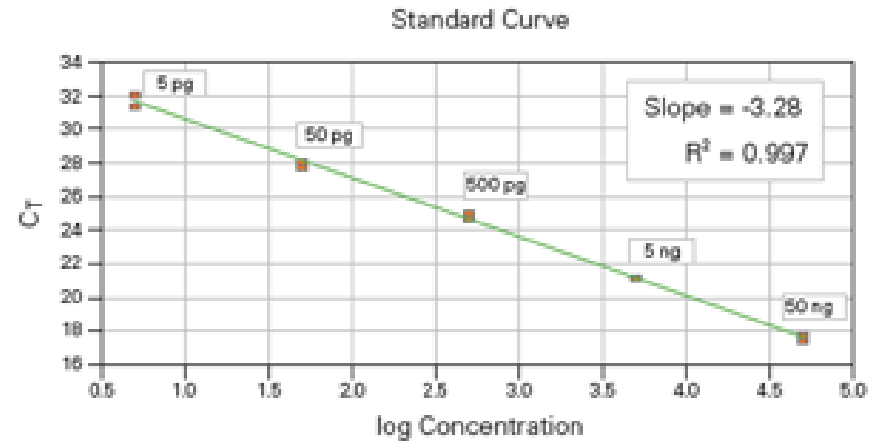
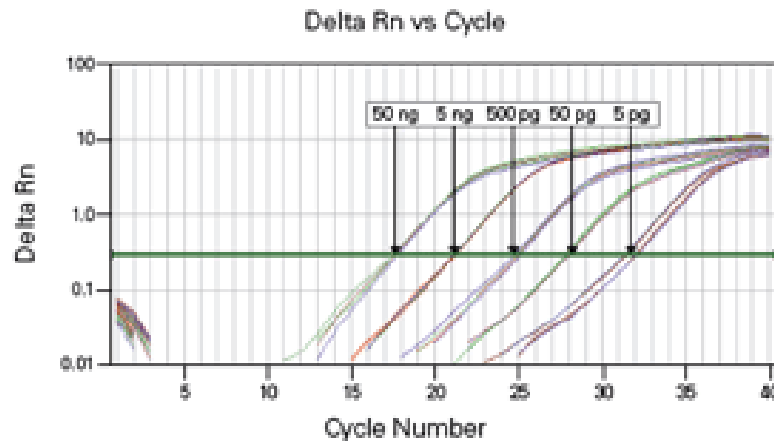
Як виявити інгібітори – контролі ПЛР



Інгібування флуоресцентного сигналу – «згладжені» ПЛР-криві

Оцініть розгорання кривих ВКЗ та цільової мішені з кривими ПКО

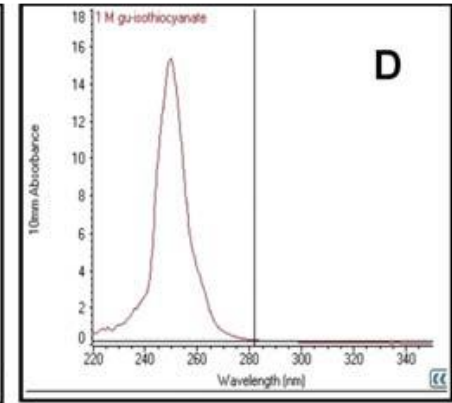
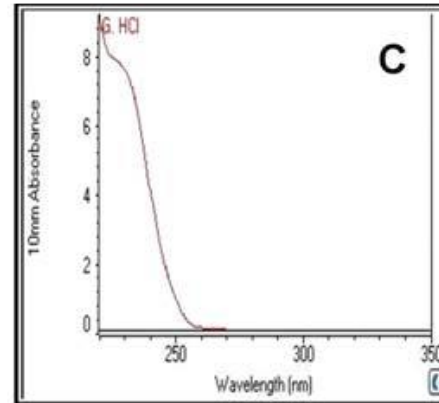
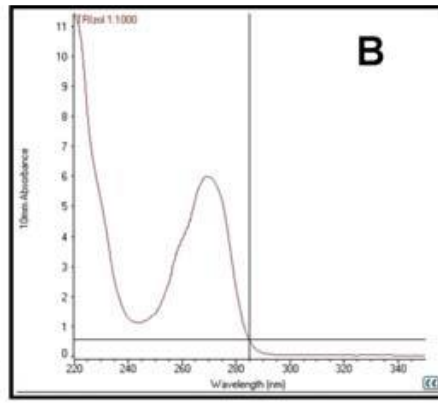
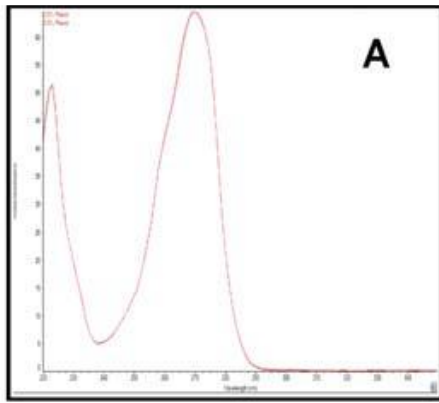
Як виявити інгібітори – контролі ПЛР



Кількісна ПЛР

- qPCR зі 100% ефективністю нахил графіка дорівнює -3,32
- Кут нахилу від -3,3 до -3,6 – відмінна ефективність ампліфікації (100-90%)
- Кут нахилу менше -3,6 або більше -3,32 - можливе інгібування

Як виявити інгібітори - спектрофотометрія



Спектри звичайних реагентів, які використовуються виділення нуклеїнових кислот. А) Тризол В) Фенол С) Гуанідину хлорид та D) Гуанідину ізоціанат.

Дотримуйтесь загальних правил біобезпеки

Удосконалить методику збирання зразків

Виберіть оптимальний метод екстракції для зразків

Використовуйте валідовані комерційні набори для екстракції НК

Використовуйте стійку до інгібіторів полімеразу

Зберігайте ДНК у воді замість TE-буфера

Використовуйте енхансери, які перешкоджають дії інгібіторів

Розбавте зразок

Як запобігти
інгібуванню
ПЛР

Дякую за увагу