

HG-403p

RealQuantH3

Набор реагентов для обнаружения и определения концентрации ДНК человека методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

ИНСТРУКЦИЯ по применению (АНК, CFX96, Dt-prime/Dt-lite)





Содержание

1.	ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	3
1.1.	Описание набора	3
1.2.	Область применения	4
2.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	5
2.1.	Состав набора	5
2.2.	Количество анализируемых проб	5
2.3.	Условия хранения и транспортирования, срок годности	5
2.4.	Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	5
3.	ПОДГОТОВКА К АМПЛИФИКАЦИИ	6
3.1.	Подготовка калибровочных образцов	6
3.2.	Подготовка к проведению реакции ПЦР-РВ	6
4.	ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	8
4.1.	Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе АНК	8
4.1.1.	Установка шаблонов в программу ANKShell	8
4.1.2. калиб	Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблонов RQ, RQ-F (с проведением повки)	9
4.1.3.	Созлание и использование внутренней калибровочной кривой	11
4.2.	Программное обеспечение и провеление ППР-РВ на приборе CFX96	15
4.2.1.	Запуск ПЦР-РВ с использованием программного обеспечения CFX96	15
4.3.	Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе Dt-prime/Dt-lite	.17
4.3.1.	Создание теста (шаблона эксперимента)	17
4.3.2.	Установка шаблона	21
4.3.3.	Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3	22
4.4.	Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе Gentier 96	24
4.4.1.	Создание шаблона эксперимента	24
5.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	28
5.1.	Обработка результатов работы прибора АНК	28
5.2.	Обработка результатов работы прибораСFX96	30
5.3.	Обработка результатов работы прибора Dt-prime/Dt-lait	30
5.3.1.	Анализ данных	30
5.3.2.	Автоматическая оценка результатов полученных на амплификаторе Dt-	
prime	/Dt-lait	33
6.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	36
Интер	опретацию результатов анализа проводят согласно таблице	36
6.1.	Оценка результатов анализа	37

ΞCUHTOΛ

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание набора

Набор реагентов «RealQuant H3» предназначен для обнаружения и определения количества ДНК человека, степени ее деградации и половой принадлежности.

В основе работы набора лежит метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием ТаqMan зондов.

Для повышения чувствительности детекции в наборе «RealQuantH3» используются многокопийные локусы генома человека. Амплификация многокопийных аутосомных фрагментов разного размера позволяет провести достоверную оценку количества и качества ДНК в исследуемом образце, а амплификация многокопийного фрагмента Y-хромосомы определить половую принадлежность.

В таблице приведены мишени, размер ампликонов и используемые красители:

N⁰	Мишень	Описание фрагмента	Краситель
1	aS	короткий фрагментаутосомной ДНК	FAM
2	aL	длинный фрагмент аутосомной ДНК	R6G/HEX
3	Y	ДНК Ү-хромосомы	ROX
4	IPC	внутренний положительный контроль	Cy5

Короткий фрагмент аутосомной ДНК (aS) используется для определения концентрации общей ДНК в исследуемом образце.

Длинный фрагмент аутосомной ДНК (aL) необходим для определения степени деградации ДНК в исследуемом образце. По соотношению полученных в ходе ПЦР значений концентраций короткого и длинного аутосомного фрагмента можно судить о деградации ДНК в образце и спрогнозировать необходимое количество ДНК, которое требуется внести в STR-реакцию для получения полного профиля.

Фрагмент Ү-хромосомы (Ү) позволяет определить половую принадлежность образца ДНК уже перед проведением STR-анализа. Данная мишень может использоваться для оценки смесевых образцов мужской и женской геномной ДНК, а также служить дополнительным половым маркером при возникновении сложностей с интерпретацией данных STR-анализа.

Внутренний положительный контроль (IPC) позволяет выявить искусственный, не встречающийся в природе, фрагмент ДНК. IPC подтверждает, что все компоненты набора функционируют правильно. С помощью IPC можно оценить наличие или отсутствие ингибиторов в образце ДНК и принять решение о возможности его использования в STR-реакции.

Определение концентрации ДНК проводят с помощью калибровочнойпрямой, построенной по пяти точкам с десятикратным разведением от первой точки с концентрацией 50 нг/мкл. Диапазон достоверной оценки концентрации ДНК в образце составляет от 50 до 0,005 нг/мкл.

Набор реагентов «RealQuant H3» специфичен только к ДНК человека. В результате исследований выявлено отсутствие специфичности к ДНК, наиболее часто встречающихся в обиходе человека животных, птиц и рыб (Таблица 1).

В результате набор «RealQuant H3» позволяет достоверно определить наличие или отсутствие ДНК человека, концентрацию, степень деградации и половую принадлежность даже в образцах содержащих ДНК животных, птиц и рыб.

Таблица 1. Животные к ДНК, которых проводились испытания по определению специфичности набора «RealQuant H3»



	макака
	кошка
	собака
	хомяк
	хорёк
Млекопитающие	мышь
	кролик
	коза
	овца
	свинья
	корова
	лошадь
Птицы	курица
	гусь
Рыбы	карп

1.2. Область применения

Набор может быть использован в лабораториях бюро судебно-медицинских экспертиз ив лабораториях экспертно-криминалистических центров. Результаты, полученные с использованием набора «RealQuantH3» могут помочь в:

- определении наличия ДНК человека в образце;
- определении концентрации общегеномной ДНК человека в образце;
- оценке деградации ДНК в образце;
- определении половой принадлежности ДНК в образце;
- оценке наличия ингибиторов в ДНК образце;

- определении количества образца ДНК для использования в STR-анализе в зависимости от степени деградации образца и наличия ингибиторов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

№	Наименование	Состав	Объем	Количество
1	PC RQ+	Реакционная смесь, содержащая специфические праймеры и флуоресцентно-меченые зонды	0,02 мл	104 пробирки (13 стрипов)
3	ДНК человека 💍	Стабилизированный раствор ДНК человека мужского пола в концентрации 50 нг/мкл	0,03 мл	1 пробирка
4	ДНК-буфер	Буфер для разведения ДНК человека	1,2 мл	1 пробирка
5	ОКО	Отрицательный контрольный образец	0,2 мл	1 пробирка

2.1. Состав набора

2.2. Количество анализируемых проб

Набор HG-403р рассчитан на проведение 104реакций, включая контрольные образцы.

2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности

Температура хранения – от -18до -20°С.

Транспортирование – при температуре -18 до -20°С.

Срок годности набора – 14 месяцев при соблюдении условий хранения и транспортировки.

2.4. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

1. Штатив для микропробирок объемом 1,5/2,0 мл ("PM-96x1,5 /2,0", кат. № СТ-17).

- 2. Пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл.
- 3. Штатив для ПЦР плашек или стрипов. ("ПЦР-96", кат. № СТ-12).
- 4. Дозаторы переменного объема на 1000, 200, 20 и 10мкл.
- 5. Наконечники с аэрозольным барьером для дозаторов переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.
- 6. ПЦР микропробирки объемом 0,2 мл для ПЦР-РВ.
- 7. Центрифуга для микропробирок объемом 0,2 мл.

8. Прибор ПЦР-РВ, имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G/HEX, ROX, Cy5 (AHK 32, AHK 48, CFX-96).

3. ПОДГОТОВКА К АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Подготовка калибровочных образцов

Для количественной оценки концентрации ДНК с помощью набора реагентов «RealQuant H3» требуется калибровочная прямая, получаемая с помощью постановки в ПЦР-РВ калибровочных образцов. Для приготовления калибровочных образцов используется стабилизированный раствор ДНК человека мужского пола в концентрации 50 нг/мкл, входящий в состав набора.

1. Пробирки с ДНК человека, 50 нг/мкл (КО1), и ДНК-буфером разморозить, перемешать на вортексе и центрифугировать для сброса капель.

2. Отобрать и маркировать 4 микропробирки объемом 1,5 мл (КО2, КО3, КО4, КО5).

3. Приготовить калибровочные образцы **КО2**, **КО3**, **КО4**, **КО5** в соответствии с протоколом в приведенной ниже таблице:

Стандарт	Концентрация,	Объемы	Разведение
1	НГ/МКЛ		
КО1	50	ДНК человека, 50 нг/мкл	1x
КО2	5	10 мкл КО1 + 90 мкл ДНК-буфера	10x
КОЗ	0,5	10 мкл КО2 + 90 мкл ДНК-буфера	10x
КО4	0,05	10 мкл КОЗ + 90 мкл ДНК-буфера	10x
КО5	0,005	10 мкл КО4 + 90 мкл ДНК-буфера	10x

- в подготовленные пробирки для калибровочных образцов КО2, КО3, КО4, КО5 добавить 90 мкл ДНК-буфера;

- в пробирку для **КО2**добавить 10 мкл **КО1**, используя наконечник с аэрозольным барьером; тщательно перемешать сначала пипетированием, затем на вортексе, кратковременно центрифугировать для сброса капель;

- в пробирку для **КОЗ** добавить 10 мкл **КО2**, используя наконечник с аэрозольным барьером; тщательно перемешать сначала пипетированием, затем на вортексе, кратковременно центрифугировать для сброса капель;

- в пробирку для **КО4** добавить 10 мкл **КО3**, используя наконечник с аэрозольным барьером; тщательно перемешать сначала пипетированием, затем на вортексе, кратковременно центрифугировать для сброса капель;

- в пробирку для **КО5** добавить 10 мкл **КО4**, используя наконечник с аэрозольным барьером; тщательно перемешать сначала пипетированием, затем на вортексе, кратковременно центрифугировать для сброса капель.

ВНИМАНИЕ!!! После добавления каждого образца КО необходимо менять наконечник. После добавления ДНК раствор необходимо пипетировать не менее 10 раз. Приготовленные калибровочные образцы ДНК могут храниться при температуре от +2°C до +8°C в течение 10 сутокдля повторного использования.

3.2. Подготовка к проведению реакции ПЦР-РВ

1. Разморозить требуемое количество стрипованых пробирок с PC RQ+ кратковременно центрифугировать для сброса капель.

2. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в пробирки (на стенку) по 2 мкл исследуемых образцов, отрицательный контрольный образец (ОКО), калибраторы КО5, КО4, КО3, КО2 и КО1.

3. Закрыть ПЦР пробирки.

4. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать 30 секунд при 3000 об. мин. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

СИНТО

5. Поместить пробирки в прибор в соответствии с порядком следования образцов и запустить программу амплификации.

	А	В	С	D	Е	F	G	Η
1	КО1	КО1	КО2	КО2	КОЗ	КОЗ	КО4	КО4
2	КО5	КО5	ОКО	ОКО	ИО1	ИО2	ИО	
3								
4								
5								
6								

Рекомендуемый порядок следования образцов в приборе АНК

Рекомендуемый порядок следования образцов в приборе CFX96

					11	11						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Α	КО1	КО1										
В	КО2	КО2										
С	КОЗ	КОЗ										
D	КО4	КО4										
Е	КО5	КО5										
F	ОКО	ОКО										
G	ИО1	ИО										
Η	ИО2											

где КО – калибровочный образец, ОКО – отрицательный контрольный образец, ИО – исследуемый образец.



4. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 4.1. Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе АНК

ВАЖНО!!! Перед использованием набора реагентов «RealQuant H3» на приборе АНК 32/48 необходимо установить шаблон набора в программное обеспечение прибора.

Существуют несколько различных шаблонов для работы с набором «RealQuantH3» на приборе АНК, устанавливаемые в зависимости от модели прибора:

Название шаблона	Описание шаблона
RQ	Стандартный шаблон
RQ-test	Шаблон с использованием внутренней калибровки
RQ-F	Шаблон для быстрой ПЦР (40 мин)
RQ-F-test	Шаблон для быстрой ПЦР (40 мин) с использованием
	внутренней калибровки

Шаблоны RQ и RQ-F предназначены для проведения анализа с обязательной постановкой калибровки.

ШаблоныRQ-testuRQ-F-test предназначены для проведения анализа с использованием внутренней калибровки, полученной предварительно при использовании шаблонов RQ и RQ-F.

4.1.1. Установка шаблонов в программу ANKShell

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

2. Для установкишаблона открыть программу ANKShell, открыть папку«Новое исследование».



3. В открывшемся окне выбрать функцию «Импорт шаблона».





4. В проводнике выбрать файл шаблона и нажать клавишу открыть.

Открытие				×		0
> · · 🕇 📙 « Kj	риминалистика > RealQuant > Ша	блоны для АNК 🗸 🖑	Поиск: Шаблоны для А	NK ,P	К. Д.	U
Ипорядочить - Нов	ая папка					-
Этот компьютер	Имя	Дата изменения	Tun	Размер		and the second
🗑 Видео	RQ.mank	22.01.2020 14:40	Файл "МАНК"	10		
Документы	RQ-F.mank	23.01.2020 13:55	Файл "MANK"	10		-
. Загодин	RQ-F-test.mank	23.01.2020 13:55	Файл "MANK"	7		
Изображения	RQ-test.mank	23.01.2020 13:54	Файл "MANK"	6		
Музыка						
🗊 Объемные объ						1000
Рабочий стол						
🎬 OS (C:)						
🚔 other (D:)						
scaner (\\192.16						
💣 Сеть 🗸 🗸	٢			>		
Vina	файла: RQ.mank	~	Шаблон (*.mank)	~		0
			Открыть О	тмена		G
				al.		
						F
48 пробирок						

Шаблон будет установлен в программу ANKShell.

4.1.2. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблонов RQ, RQ-F (с проведением калибровки)

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

2. Открыть программу **ANKShell**, открыть папку **«Новое исследование»**. В отрывшемся окне выбрать нужный шаблон: **RQ**, **RQ-F**. В левом нижнем углу указать тип прибора.

8 Новое исследование	-	
	Шаблоны	
Hassanse RQ-test RQ	Красителя: Дата "FAM" "R6G" "ROX" "Су5" 22.01.2020 "FAM" "R6G" "ROX" "Су5" 04.12.2019	•
		\bigcirc
48 пробирок		\bigcirc

- 3. Нажать клавишу «Далее» В правом нижнем углу.
- 4. Установить повторность исследуемых образцов (ИО) и их число.

		Выбор количества образцов и контро	лей	
унки 48/48			Повторы ИО 2	~ (
еактор \"RQ\ Линимальное азмерность "	кол-во КО=5, ОКО=1, ПКО=0 ", Число Конгроли		Число ИО – 18,0	
Выбор Тип	Название	Повторов		
🖌 着	KO1	2		
🖌 🏅	KO2	2		
🖌 🏅	KO3	2		
🖌 🏅	KO4	2		
🖌 🏅	KO5	2		
🖌 🥈	око	2		G

5. Нажать клавишу «Далее» 🕑 в правом нижнем углу.



6. Внести названия исследуемых образцов.

	Ввод исследуемых образцов		
¥а Тип	Описание	Реактор	Повторы
u 🦲	12-1	RQ	2
2 👗	13-65	RQ	2
3	I	RQ	2
		RQ	2
; 👗		RQ	2
5		RQ	2
, 🧵		RQ	2
3		RQ	2
		RQ	2
0		RQ	2

ПРИМЕЧАНИЕ!!! Необходимо обозначить ВСЕ исследуемые образцы, в противном случае они будут заблокированы, и программа не будет выполнять с ними расчетных действий. Не допускается одинаковых названий для разных образцов!

7. Нажать клавишу «Далее» 🕑 в правом нижнем углу.

8. Расставить контрольные образцы и исследуемые образцы в порядке следования образцов в плашке прибора.

						Расстан	овка проб				
	1	2	3	4	5	6	7	8	à	KO1 [RQ]	î 🦸
A										KO1 [RQ]	
В									-	KO2 [RQ]	
с										KO2 [RQ]	
D										KO3 [RQ]	(****
2										KO3 [RQ]	(****
E										KO4 [RQ]	0000
F										K04 [RQ]	
										KO5 [RQ]	G
									, 👗	KO5 [RQ]	. 6

Для расстановкиобразцов существует два способа:

а) Расстановка образцов вручную с помощью курсора «мышки»;

б) Автоматическая расстановка (клавиша «Цветная плашка» справа), если порядок следования образцов (КО и ИО) в приборе совпадает с порядком, рекомендуемым в п.3.2 п.8.



ПРИМЕЧАНИЕ!!! Для сброса расстановки можно использовать клавишу «Сброс»



9. Нажать клавишу «Далее» 🕑 в правом нижнем углу.

10. Ввести название файла, номер серии pearentroв «RealQuantH3» и, по необходимости, комментарий.



11. Нажать клавишу «Старт» 🏝 в правом нижнем углу.

12. Во всплывшем окне выбрать прибор по серийному номеру и нажать клавишу «Пуск» .

4.1.3. Создание и использование внутренней калибровочной кривой

В программном обеспечении ANKShell предусмотрена функция внутренней калибровочной кривой. Это позволяет проводить калибровку не при каждой постановке ПЦР-РВ, а только при поступлении новой серии наборов. То есть исследователь получает калибровочную кривой при поступлении новой серии наборов и использует ее для расчета концентрации ДНК в исследуемых образцах при последующих постановках ПЦР-РВ на этой серии наборов.

Для использования функции внутренней калибровки, при поступлении новой серии наборов RealQuant, необходимо провести ПЦР-РВ с использованием КО, а затем сохранить калибровочную кривую, полученную в результате постановки.

ВАЖНО!!! Внутренняя калибровочная кривая, полученная с использованием шаблона RQ, может использоваться только для проведения ПЦР-РВ с использованием шаблона RQ-test. Внутренняя калибровочная кривая, полученная с использованием шаблона RQ-F, может использоваться только для проведения ПЦР-РВ с использованием шаблона RQ-F.

4.1.3.1 Создание внутренней калибровочной кривой

1. Используя шаблон «**RQ**» или «**RQ-F**» (в зависимости от типа амплификатора и выбранной циклограммы (быстрой или стандартной)), провести ПЦР-РВ с получением калибровочной кривой.

2. После проведения ПЦР-РВ убедиться, что калибровочная кривая соответствует необходимым параметрам по каждому из красителей. Для этого в правом нижнем углу экрана кликнуть по графе «Калибровка».

Для калибровочной прямой должны выполняться ВСЕ нижеперечисленные условия:

- коэффициент корреляции R² не ниже 0,99;

- эффективность ПЦР Е составляет не менее 95%.

Получение иных значений этих параметров для калибровочной кривой свидетельствует об ухудшении работы реактивов или неправильной подготовке к проведению реакции.





3. В открывшемся окне выбрать поочередно каждый краситель и удостовериться, что значения Еи \mathbf{R}^2 отвечают требуемым критериям.



4. Если значения E и \mathbb{R}^2 укладываются в требуемые параметры, кликнуть по иконке «Сохранить».

ВАЖНО!!! Если значения E и \mathbb{R}^2 не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными КО. Если параметры калибровочной кривой снова не будут соответствовать требуемым значениям, приготовить новые калибраторы и провести ПЦР-РВ. Использовать для количественного анализа калибровочную прямую с параметрами, не соответствующим требуемым критериям, ЗАПРЕЩЕНО!





5. Во всплывшем окне сохранить файл калибровки с использованием названия набора и датой получения калибровки. Сохраненный файл с калибровочной кривой можно использовать для расчета концентрации ДНК в исследуемых образцах при последующих постановках ПЦР-РВ на этой серии наборов.

130018	ца Ин	формац	ня о файле		۰×	График	c							_	_
					1 1 2									<u>≅</u>	6
os. 0	писание	Реактор	Тип												
KC	01	RQ	KD												
K(01	RQ	KD												
RC.	02	RQ	KD			_								2	
K	02	RQ	KD	🧟 Калибровка								-			
K	03	RQ	KD								~				
KC	03	RQ	KD	S Coxpanenze							~				
K	04	RQ	KD	← → ~ ↑ • « OS (C:) >	ANKDevices > Cr	olibration		v ð	Поиск: Со!	bration	p	Cy5			
K	04	RQ	KD												
K	05	RQ	KD	Упорядочить • Новая папка						1122	• 😧				
K	05	RQ	NO	Accounts ^ Mus		<		Data uta concentration	Tun		Dames				
0	KD	RQ.	OKO					para namenena			- manuf				
0	KO	RQ.	OKO	Загрузки		Нет элем	CHT05, V208/H	TEOOROLLINX VC/N	овиям поиска.						
1		RQ	NO	изображения											
2		80	NO	Музыка											
3		RO.	100	Concernance of the											
4		PO	100												
	·	The last	10	Расочии стол											
				OS (C:)											
				dther (D:)											
				— НИКУЛИНА (E:										(P	
				01102161								P*2	-	выполненные методы	
				Scarler (((192.10)							-	0.9997	100,4723	# <u></u>	
					-						- '	0,000	100,4120	10.00	
				Имя файла: rQ110220							~			Искодные данные	
				Two dation * Calib	-								V A	Сглахивание	
				Thu danas								RQ	RQ	Привязка к нулю	
										-			:	Привязка к максимуму	
				 Скрыть папки 					Содрания	16 O1	мена			Расчет порогового цикла	
				L		-	-					14	-	Калибровка	
						С	ж		ж ж			*	*	Концентрация	
														Паранк тивность	
						D	*	*							

4.1.3.2 Настройка и использование внутренней калибровочной кривой

1. Для использования при расчете концентрации ДНК в исследуемых образцах внутренней калибровочной кривой необходимо, при запуске ПЦР-РВ в программе «ANK Shell», выбрать шаблон «RQ-test» или «RQ-F-test» (в зависимости от типа шаблона, который был выбран при получении калибровки).

2. Провести ПЦР-РВ, используя только **ОКО** (отрицательный контрольный образец) и **ПКО** (один из калибровочных образцов).

3. После прохождения ПЦР-РВ открыть файл с результатами исследования. Во время анализа данных появится окно, в котором кликнуть по правой иконке





4. Во всплывшем окне кликнуть по папке «Открыть»



5. В окне с файлами калибровок выбрать необходимый файл и нажать «Открыть». После этого калибровка будет применена к анализируемому файлу с исследуемыми образцами.

профик пролица	dalas	• X	Toober									
	👧 Kanedpoexa									-	o x	
	🙍 Открытие					_	×					
	← → · ↑ 🔤 = AJ	RDevices > Colibration	~ ð	Reecc Colibs	noite	p		M R6G	RDX			
	Упорядочить - Нов	an merika			81 -			es. Report	(ware	Kon.		
	OneDrive Three constructions The constructions Th	Vise S.Celib R0210120.Calib R0210120.calib R0210120.calib R0210120.calib R021017.Calib XV000177.Calib XV100717.Calib	т: Фейл "САЦВ знер: 2,24 КБ та изменение 2	Дата изме 21.01.2018 21.01.2020 21.01.2020 03.00.2017 11.01.2020 19:30	10:57 16:01 19:30 11:41 18:54	Tan Baile 10 Baile 10 Baile 10 Baile 10 Baile 10	CALE CALE CALE CALE	A 2.0000	B 1,0000	R*2	B# 0.0000	Place NetTrague
	Pose	failer [,	*.Calib Orepurs	1	Отмена	2.1	#0 ofg.5(27. 05. #0 #0	RG KD RG	R0 010 # R0 #	Paperov.	а к нулю а к наконтуну аропового цекла
			D	х х х х	ж ж	ж ж	*	x x	ж ж	*		
					121					¥ 0		



6. Далее открыть вкладку «Файл» в левом верхнем углу и выбрать пункт «Сохранить как шаблон».

	Открыть			•	• ×	График							
	Сохранит Сохранит	ь ь как										2	
	Сохранит	ь как шаб	юн			2 600					T		1
91	Параметр	ы				2 400							
ē 1	Описание	образцов				2 200						2 Port	71
	Компенса	ILINA				2 000					111	applinence -	
	Матрица					1 800							1
						1 600							M
•	Выход					\$							IX
8	KO4	RQ	KO			5 1400					111 110111		1
1	KO5	RQ	KO			ž 1 200							11
2	KO5	RQ	KO			⁰ 1 000						9 11/	1
3	ОКО	RQ	OKO			800							/
4	ОКО	RQ	OKO			600							1
5	1	RQ	ON			000							/
6	2	RQ	NO			400						11 1	
17	3	RQ	NO			200							
8	4	RQ	ON			0	-						_
						-	4 6	8 10 12	14 16	18 20 22 24 26 Пороговый цикл	28 30 32 3	4 36 38	40
						Планшет Ан	ализ			~ ×	Выполненны	е методы	
							and local						

7. В окне с шаблонами выбрать «**RQ-test**» или«**RQ-F-test**» (в зависимости от типа шаблона, который был выбран в п.1) и нажать Сохранить. Файл шаблона сохранится с использованием выбранной внутренней калибровки.



8. При последующих запусках ПЦР-РВ с использованием шаблона «**RQ-test**» или «**RQ-F-test**» для расчета концентрации ДНК исследуемых образцов будет использоваться «привязанная» внутренняя калибровка.

ПРИМЕЧАНИЕ!!! При получении новой серии наборов необходимо получить новую калибровочную прямую в соответствии с п.4.1.2-4.1.3.

4.2. Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе CFX96 ВНИМАНИЕ!!! Проведение ПЦР-РВ-анализа с помощью набора «RealQuantH3» на приборе CFX возможно только с получением калибровочной прямой при каждой постановке.

4.2.1. Запуск ПЦР-РВ с использованием программного обеспечения CFX96

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

2. Запустить программу «Bio-Rad CFX Manager».

3. В меню File выбрать New→Protocol. В появившемся окне задать циклограмму со следующими параметрами:

Sample Volume 25 µl



- 1. 95,0C for 1:40
- 2. 95,0 C for 0:12
- 3. 57,0 C for 0:15
- 4. 64, 0 C for 0:15 +Plate read
- 5. GOTO 2, 44

END

Нажать ОК и сохранить протокол на компьютере в удобной рабочей папке.

4. Для внесения сведений об образцах и красителях во вкладке Plate выбрать опцию Create New. Курсором выделить поле с лунками, в которых установлены пробирки, и в графе SampleType временно обозначить все занятые лунки как Unknown, выбрав в правом верхнем углу соответствующую строчку Unknown.

5. Нажать кнопку Select Fluorophores. В появившемся окне выбрать красители FAM, HEX, ROX, Cy5. Нажать OK. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям: поставить «галочки» в колонке Load напротив названий всех выбранных красителей.

Plate	Editor - Ne	200												- 0	×
File Tur Se	Edit ndo (22) tup Wizard	Settings Redo 🔚 I 🚨 Us	Editing Too Save 🔯 ser Preferen	ls Zoom 10 ces 🔫	10% ∨ Plate Load	ing Guide	n Mode 🛛	II Channels	~	😤 Well (Groups	\land Trace :	Styles	🔍 Spreadsheet View/Importer	
	1 Unk	2 Unk	3 Unk	4 Unk	5 Unk	6 Unk	7 Unk	8 Unk	9 Unk	10	11	12		Select Fluorophores	
A	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5					Sample Type Unknown	~
в	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5				=	Target Names Load ✓ FAM ✓ Load ✓ HEX ✓ Inord ✓	+++
с	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5					Load Cy5 (none) V Sample Names	+
D	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5					Load Crone>	+
E	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5	Unk FAM HEX ROX Cy5					Show Biological Groups	i
Plate	e Type: BR I	Clear 🗸	w Sample 🗌	Well Group	Well I	Note								OK Car	ncel

6. Задать сведения об образцах (тип, имя, концентрация):

- Лунки A1-2-E1-21 и 2 ряда калибровочные контрольные образцы КО. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с КО, и в графе Sample Type выбрать строчку Standard. Обязательно задать концентрацию каждого калибровочного образца, для чего выделить A1-2 лунки, куда внесен КО1, в графе Concentration вписать концентрацию КО1 50, повторить тоже самое для КО2 5, КО3 0,5, КО4 0,05, КО5 0,005.
- Лунки F1-2 **ОКО.** Выделить лунки, в которых находится пробирки с ОКО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Negative Control**.
- Следующие лунки исследуемые образцы в соответствии с порядком внесения образцов и ОКО-В. Выбранный тип образца Unknown. Задать названия всех исследуемых образцов. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с обозначаемым образцом, и в графе Sample Name ввести (или выбрать из уже имеющихся) имя соответствующего образца, затем поставить

SCИНТОЛ

«галочку» в соседней графе Load или нажать клавишу Enter. Повторить то же самое для оставшихся образцов.



7. Нажать **ОК**. Дать имя плашке с указанием даты эксперимента и сохранить полученный файл на компьютере в удобной рабочей папке.

8. Начать работу прибора. Для этого выбрать закладку **Start Run**, в которой нажать клавишу **Start Run**. Задать имя будущего файла с указанием даты проведения эксперимента. Сохранить файл на компьютере в удобной рабочей папке.

4.3. Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе Dt-prime/Dt-lite ВНИМАНИЕ!!! Проведение ПЦР-РВ-анализа с помощью набора «RealQuantH3» на приборе Dt-prime/Dt-lite возможно только с получением калибровочной прямой при каждой постановке.

4.3.1. Создание теста (шаблона эксперимента)

1. Открыть программу RealTime PCR

2. Выбрать «Тест» в верхнем меню. Из выпавшего списка нажать «Создать/Редактировать тест»

RealTime_PCR_A5F802			– 🗆 ×
Режим Тест Настройки Помощь	-		
Создать/Редактировать тест	ограммы амплификации	🔢 Новый протокол 🛛 🔓 Открыть	. Сохранить 🛛 🛺 Просмотр архива
🈁 Копировать группы тестов		L	
Номер протокола: 0	Имя Оператора: Гость	V	Дата: 28 Июнь 2022
№ Идентификатор R Тест Тип пробирк	Концентрация и 🥥 🔉 🔉 🖉 Fam Hex Rox	Су5 Су5.5	Лультитест Добавить

3. В открывшемся окне кликнуть по иконке «Создать новый тест» создать/Редактировать тест

	1 Amplitub-BV	^	🛃 Редактиров	зать текущий тест
	HY	- I I	 (2)	алать новый тест
	LAMP-01			одать повыл тест
	SARS		😂 Копиров	вать текущий тест
	SARS короткий		Vna Vna	пить текущий тес:
	SARS-CoV-2			in to rongagini roo
q+	SARS-CoV-2 Syntol			
q+	SARS-CoV-2_Syntol q+	v2.0		
	SARS-CoV-2 Syntol g+	~		Отмена



4. Ввести «RealQuantH3» в поле имени нового теста и нажать клавишу «Ok»

Введите имя нового т	еста	
RealQuant H3		
многотестовый ре	жим	
	Ok	Отмена

5. Во всплывшем окне в пункте 1 «Анализ» в строке «Тип» выбрать «Количественный со стандартами»

Тест:	RealQuant H3	·													
Описание:															
Параметры:															
1 Анализ:		5 0	бъём ра	боч	ей	сме	зи	вп	ообири	e.			35		мкл
Тип:	Количественный со стандартами		e e e e e e e e e e						e e e e e e e e e e e e e e e e e e e						
Метод:	Количественный со стандартами	- 6. 9 ^ _	Рлуороф Бат	оры		Hev			Ro		0	0	5	<u>a</u> 0	.5.5
2. Пробирки:	Относительный	lĒ	C N		0		~		-	~		-	~		
	Анализ полиморфизмов, 2 краски	7. П	lараметр	ыа	на	пиза	па	лик	лорфи	зма	B:				
	Анализ полиморфизмов, плавление (a)														
з. стандарты:	Анализ полиморфизмов, плавление			Г	ете	ерози	па	та	dCp <		2.0		÷.		
	Анализ полиморфизмов, эталоны Н Δ DBB			Г	ом	озиг	ота	a dO	Cp >		5,0		A V		
	HLA DQ														
Раститровка	RHD														
	Gender														
Формат:	EMIA	8 1			MAT	niachi	-								
Обычный	1 1 1 1 1 1	0.11	ipoi paivii			u interne	INC		a.	_					
Научный	Биоценоз											4	7		
	Мультиплекс_q+														
	LIDV														
	FIF V														
4. Контроли:	Мультиплекс														
4. Контроли:	Мультиплекс АZF														
4. Контроли:	нг v Мультиплекс АZF														
4. Контроли:	нг v Мультиплекс АZF ИммуноКвантэкс														

6. В строке «Метод» выбрать «Пороговый (Сt)»

Описание:										
Параметры:										
1. Анализ:			5.00	бъём раб	бочей	смеси в	пробирк	e:	35	MK
Тип:	Количественный со	стандартами 🗸								
Метод:	Геометричес	кий (Ср) 🗸	6. 4	луорофо	ры:	11			0.5	
	Порогов	ый (Ct)		Fam ∨	•	Hex V	Hox	~ •	Cy5 V	Uy5.:
2 Пробирки:	Геометриче	еский (Ср)		c v		c v	-	~	- ~	-
	Стандарт		7. Па	араметри	ы ана	ализа пол	иморфи:	SMOB:		
	⊠контроль+									
3. Стандарты:	K	D. d			Гет	ерозигота	a dCp <	2,0	*	
	Количество: 4	Дуоли: 2			For	40914E0T3 (1Co >	5.0		
					1.01	10001101010	Job >		Ŧ	
Раститровка		копии •								
	Стандарт_1	0,00E+00								
Conter	Стандарт_2	0,00E+00								
О Обычный	Стандарт_0	0.00E+00	8. Np	ограмм	а амі	плификац	ии:		_	_
• Научный	erender _ r	0,002.00							2	
Cridyandar										
() Hayanbur										
() Hay those										
4. Контроли:										
4. Контроли:	Положительный (К+):	2								
4. Контроли:	Положительный (К+): Отрицательный (К-):	2								
4. Контроли:	Положительный (К+): Отрицательный (К-):	2 × 2 ×								



7. В пункте 2 «Пробирки» снять отметку у «контроль+»

2. Пробирки:	✓ образец ✓ стандарт ○ контроль+	⊠контроль-	
--------------	----------------------------------	------------	--

8. В пункте 3 «Стандарты» в строке «Количество» установить значение 5 в строке «Дубли» – 2. Выбрать формат «Научный».

- 3. Стандарты Количество: 5 Дубли: 2 Hex • • копий Раститровка Стандарт_1 5,00E+01 Стандарт_2 5,00E+00 Стандарт_3 5,00E-01 Формат: Обычный Стандарт_4 Стандарт_5 5,00E-03 • Научный
- 9. В графе каналов выбрать FAM



10. Установить следующие значения концентраций для стандартных образцов (контрольные образцы-КО) в графе «Копий»

Название	Концентрация 50нг/мкл
Стандарт_1 (КО1)	50
Стандарт_2 (КО2)	5
Стандарт_3 (КОЗ)	0,5
Стандарт_4 (КО4)	0,05
Стандарт_5 (КО5)	0,05

11. Такие же концентрации стандартов (КО) установить для каналов НЕХ и ROX

	A 11-11	
Раститровка	Hex •	копии
. domposite	Стандарт_1	5,00E+01
	Стандарт_2	5,00E+00
Формат:	Стандарт_3	5,00E-01
Обычный	Стандарт_4	5,00E-02
Научный	Стандарт_5	5,00E-03

12. В пункте 4 «Контроли» установить значение 2 в графе «Отрицательный (К-)»

ч. поптроли.			
	Положительный (К+):	2	Ť
	Отрицательный (К-):	2	



13. Установить объем рабочей смеси – 22 мкл

14. В пункте 6 **«Флуорофоры»** для каналов FAM, HEX, ROX выбрать **«Специфика»**, для канала Cy5 – **«ВК»**.

 5. Объём 6. Флуора 	раб	іочеі ры:	й смес	СИЕ	впр	обирке	9:		2	2		Mł	кл
Fam	~	•	Hex	~	•	Rox	~	•	Cy5	~	•	Cy5.	5 ~
С	~		С	~		С	~		BK	\sim			~
Специфи ВК отсутству	ка ует	ан	ализа	по	лим	юрфиз	мо	в:					

15. Создать программу амплификации кликнув по иконке.

3. Программа амплификации:	_

16. В открывшемся окне отметить «Предварительный нагрев» и нажать клавишу «Применить»

]*	—]×		_	Настроить
]×]×]×]×	
Предварителы	ный нагрев			

17. В поле «Имя программы» написать «RealQuantH3» и установить следующие параметры амплификации

рограммы: RealQuantH3 Описание: N 6 блока Температура °С минн Сек Число циклов 1 95.0 1 40 1 95.0 0 12 2 57 0 15 44 64.0 0 15 1 64.0 0 15 1 7 6 лока • Цасальть блок • • Одо Уделить строку Уделить блок • • Одо Уделить строку Фа Уделить блок • • Одо Уделить блок • • Одо Уделить блок • • Одо Уделить блок • • Одо Уделить строку Фа Уделить блок • • Одо Уделить блок • • Одо • ОДОО • ОДО • ОДО • ОДО • ОДОО • ОДОО • ОДОО • ОДОО • ОДОО •	ř							
№ блока Температура °С мин сек Число циклов С (++ Добавить блок) © после 1 95,0 0 12	программы:	RealQuantH3	Описание:					обавить строку Одо
1 95,0 1 40 1 2 57 0 15 44 Im Gnoka 64.0 0 15 44 Im Gnoka Other is the second sec	N≌блока	[Температура °С	[мин	сек	Число циклов	ŵ	▲	Добавить блок 💿 после
95.0 0 12 57 0 15 44 Im fineka 64.0 0 15 44 Im fineka 93.0 0 15 95 Nparter Grack 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1	95,0	1	40	1			/далить строку
2 57 0 15 44 Гип блока 64.0 0 15 Шкл Пауза Уранение Уране		95.0	0	12				Удалить блок
64.0 0 15 Пауза Уранение Уранение "Кривая плавления" Пемпературный перепад по матри. Инкремент по времени Инкремент по температуре Инкремент по температуре 1 95,0°C 95,0°C 0:01:40 0:00:12 57,0°C 0:00:15 0:00:15 0:00:15	2	57	0	15	44	∢	Тип бл	юка
х1 95,0°С 0:01:40 x 44 95,0°С 0:00:15 0:00:15 0:00:15 0:00:15		64,0	0	15				кл
x1 Ублос 95,0°С 95,0°С x 44 95,0°С 95,0°С 95,0°С 64,0°С 0:01:40 0:00:12 57,0°С 0:00:15							Xp	анение
x1 у Пемпературный перепад по матриц 95,0°С 95,0°С x 44 95,0°С 95,0°С x 44 0:01:40 0:00:12 64,0°С 57,0°С 0:00:15 0:00:15							O"K	ривая плавления"
x1 у Инкремент по времени 95,0°С 95,0°С x 44 95,0°С 95,0°С x 44 0:01:40 0:00:12 64,0°С 57,0°С 0:00:15 0:00:15							Te	мпературный перепад по матри.
х 1 95,0°С 0:01:40							II	кремент по времени
x1 95,0°C 0:01:40 57,0°C 0:00:12 57,0°C 0:00:15 57,0°C 0:00:15								кремент по температуре
95,0°C 0:01:40 0:01:40 0:00:12 0:00:15 0:00:15			x l					x 44
0:00:12 0:00:12 64,0°C 57,0°C 0:00:15 0:00:15			95,0°C			95,0°C		
64,0°C 57,0°C 0:00:15			0:01:4	•		0:00:12		
57,0°C 0.00.15 0:00:15	-							64.0°C
0:00:15								57,0°C 0:00:15
	-							0:00:15

SCUHTON

- 18. Кликнуть по клавише «Ok», в открывшемся окне выбрать директорию для сохранения программы амплификации и сохранить.
- 19. Затем нажать клавишу «Ок» в окне теста и выбрать папку для его сохранения. ô Тест

lect:	RealQuant H3	~]													
Описание:																
Параметры:			1													
1. Анализ:			5.0	Объём	1 pa6	боче	й сме	СИВ	зпр	обирк	e:		[22	A M	кл
Тип:	Количественный со	стандартами 🗸	6	Daver												
Метод:	Пороговый	й (Ct) 🗸		+луор Fan	n v	ры:	Her	~	0	Box	~	•	Cv5		Cv5	5 \
			Ĩ	C	~	-	C	~	-	C	~	-	C,0	~	- 0,0	
2. Пробирки:	🗹 образец	Иконтроль-		-			-			-						
	Контроль+		7. [TapaM	етры	ы ан	ализа	по	лим	орфи	BMOE	80				
3. Стандарты:		1.000 co. co <u></u>				-				C		2.0		*		
	Количество: 5	Дубли: 2				Te		ИГО	та о	up <	4	2,0		*		
						Гот	мозиг	ота	dC	p >	Ę	5,0		Ŧ		
Pactutoopra	🗢 Fam 🔻	копий 🔻														
Гастипровка	Стандарт_1	5.00E+01														
	Стандарт_2	5,00E+00														
Формат:	Стандарт_3	5,00E-01	8. [Прогр	амм	а ам	плиф	ика	ции							
Обычный	Стандарт_4	5,00E-02			Г		Real	Oua	ntF	13	_		2		1	
Научный	Стандарт_5	5,00E-03						2 au								
					1.	95	0°C	- 0	:01:	40						
4. Контроли:					2.	95	0°℃.	- 0	:00:	12			٦			
	Положительный (К+):	2				57	0°C	- 0	:00:	15 🗑	1			x 44		
						64	0°℃	- 0	:00:	15						
	Отрицательный (К-):	2														

4.3.2. Установка шаблона

Актуальную версию готового Шаблона можно получить по запросу от производителя набора.

- Открыть программу RealTime PCR 1.
- 2. Выбрать «Тест» в верхнем меню. Из выпавшего списка нажать «Копировать группы тестов»

RealTime PCR

🔇 Real1	Time_P	CR					—		\times
Режим	Тест	Настройки Помощь							
Δ	4	Создать/Редактировать тест	ограммы амплификации	Новый протокол	🚰 Открыть	. Сохранить	🕴 🗔 Пр	осмотр ар	жива
	3	Копировать группы тестов							

3. В открывшемся окне выбрать «из ini файла»

Гость 🗸		~	
Гость			
RealQuantH3	v1.1		
/ 2 теста(ов)	Se		

СИНТО

4. Во всплывшем окне выбрать файл с шаблоном и нажать «Открыть» для импорта в программное обеспечение RealTime PCR.

4.3.3. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3

- 1. Открыть программу **RealTime PCR**
- 2. Кликнуть по клавише «Добавить тест».

ven r	_						1			- IODDATE								-		-
-icp i	протокола: 0			÷	Имя Оператора:			Гость		~						I	Дата:	28 MH	онь 202	22
Nº	Идентификатор	R	Тест	Тип пробирки	Концентрация	Fam	Hex	Rox	Cy5 C	5.5	Xmil N	мпорт	1	Мульт	итест	Доб	авить			
									_		(*	Д	обавит	љ тест		0,	10		Опос	ле
											ে ব	Доб	авить	строк)	r					
											-	Удал	пить с	троку			омат Обычны	ый		
												Отмен	ить про	йствия		0	Научнь	NA.		
												1 2	3	4	5 6	7	8	9	10 1	1
											A		⊢	-	+	┿	⊢	-	_	-
											c	+-	H		╈	╈	H		+	-
											D		П		Ť		Ħ			-
											E									
											F					ļ				
											G		Щ	4			Ц	_		_
											H									_

3. В открывшемся окне в строке «**Tect**» выбрать шаблон **RealQuant H3**, в пункте 1 «**Образцы**» установить 0 и нажать клавишу «**Ok**».

Tech.	RealQuantH3	~	Все тесты	•
Описание:				1
Тип анализа:	Ka	чественный		2
 Образцы: Стандарты: 	Количество: 0 💌	Дубли: 1	•	
3начения	стандартов из другого протокола	3		
	Количество: 5	Дубли: 2	▲ ▼	
3. Контроли:				
	Положительные (к+).			
		-		

4. Выделить строку под «К-» и используя клавишу «Добавить строку» добавить необходимое кол-во исследуемых образцов.

RealQuant H3



ким	Te	ст Настройки		Помощь				,					_ ,
× ×××	ž×x ž×x	Протокол	1	<u>•</u> -Q	Запуск про	граммы амплифи	кации				Ho	вый	протокол 🚰 Открыть Сохранить 🕴 🗔 Просмотр архив
Hon	иер п	ротокола: 0			•	Имя Оператора:			Гость		~		Дата: 28 Июнь 2022
	N≏	Идентификатор	R	Тест	Тип пробирки	Концентрация	e Fam) Hex	Rox	Oy5	Q Cy5.5	^	импорт Мультитест Добавить
A1	1	Стандарт_1	Q	RealQuantH	0	0	*	-	*	√ _{BK}	-		СН≘ Добавить тест
81	2	Стандарт_1		RealQuantH	0	0	*	*	*	€к	-		
1	3	Стандарт_2	9	RealQuantH	0	0	•	•	•	√ _{BK}	-		Формат
)1	4	Стандарт_2	0	RealQuantH	0	0	*	*	*	₩ BK			 Удалить строку Обычный
1	5	Стандарт_3	3	RealQuantH	0	0	*	*	*	₩ BK	-		Х Очистить протокол
1	5	Стандарт_3	0	RealQuantH	0	0	*	*	*	*BK	-		Отменить действие
	2	Стандарт_4	3	RealQuantH	0	0	-	-	-	BK	-		
2	9	Стандарт_4	0	RealQuantH	ŏ	0	2	-	-	ВК			1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
2	10	Стандарт 5	3	RealQuantH	õ	0	4	4	~	EK			
2	11	K-	\cap	RealQuantH	K-		*	*	*		-		
2	12	K-	Ō	RealQuantH	К-	•	*	*	*	√ BR	-		
						-	-	-	-	-	-		
_													
_													
-													н 🚯
-													Автозаполнение 27 Очистить поле матриць
-													Порядок заполнения
													"Сеободное" гаротнение
												Y	Применить Отмена

5. В поле «Идентификатор» указать названия образцов согласно их порядку в планшете.

🍪 Re Режил	alTir 1	ne_PCR Гест Настройки	1	Помощь									- 0
à.,	ă×,	Протокол		0-1 0	Вапуск про	граммы амплифи	кации				Нов	ый п	протокол 🞯 Открыть Сохранить 🔢 🗔 Просмотр архи
Ho	мер	протокола: 0			•	Имя Оператора:					~		Дата: 28 Июнь 2022
	N≏	Идентификатор	R	Тест	Тип пробирки	Концентрация	Fam) Hex	Rox	Cy5	Cy5.5	^	импорт Мультитест Добавить
A1	1	Стандарт_1	6	RealQuantH	0	0	•	•	•	√ _{BK}			Добавить тест 💿 до Опосле
B1	2	Стандарт_1	9	RealQuantH	0	0	*	•	•	√ _{BK}	-		
C1	3	Стандарт_2	6	RealQuantH	0	0	*	-	-	√ _{BR}			Формат
D1	4	Стандарт_2		RealQuantH	0	0	*	*	*	√ ER			 Удалить строку Общини то работ
E1	5	Стандарт_3	0	RealQuantH	0	0	*	*	*	√ BR	-		Х Очистить протокол
F1	6	Стандарт_3	9	RealQuantH	0	0	*	*	*	√ BR	•		Отменить действие
G1	7	Стандарт_4	6	RealQuantH	0	0	•	•	•	√ _{ER}	-		
H1	8	Стандарт_4		RealQuantH	0	0	*	*	*	√ BR			
A2	9	Стандарт_5	6	RealQuantH	0	0	•	*	•	√ _{BK}			
B2	10	Стандарт_5		RealQuantH	0	0	*	*	•	√ BK	-		
C2	11	K-	0	RealQuantH	K-	-	*	*	•	√ _{BK}	-		B 2 10
D2	12	K-	0	RealQuantH	К-	•	•	*	-	√ BK	-		
E2	13	12-3	0	RealQuantH		-		-		-			
F2	14	новый Образец	0	RealQuantH		-	-	-	-	•	•		
G2	15	новый Образец	0	RealQuantH		-	-	-		-			
H2	16	новый Образец	0	RealQuantH		-	•	-	-	-	•		
A3	17	новый Образец		RealQuantH		-	-	-	-	-	-		C 🕢 🔟
													H (8) 16
													С на гозаполнение С Очистить поле матрица
													Порядок заполнения
_													"Сеободное" заполнение
_												~	Отмена Отмена

6. Назначить мишени для исследуемого образца. FAM, HEX, ROX – специфика; Су5-ВК. Нажать «Применить» в правом нижнем углу.

RealQuant H3



Hor	1ep I	протокола: 0			<u>^</u>	Имя Оператора:			Гост		~	Дата: 28 Июнь 2022
	Nº	Идентификатор	F	Тест	Тип пробирки	Концентрация	Спе	С ШИФИК	▼) a ox	Cy5	€ Cy5.5	жи Импорт Мультитест Добавить
1	1	Стандарт_1	G	RealQuantH	0	0		BK	7	√ EK	•	С Побавить тест
1	2	Стандарт_1	ě	RealQuantH	0	0	OTC	тствуе	T	√ BK	-	
1	3	Стандарт_2	6	RealQuantH	0	0	-	•	*	√ _{BK}	-	(Ф Добавить строку
1	4	Стандарт_2	9	RealQuantH	0	0	*	*	*	√ _{BR}	-	 Удалить строку Формат
1	5	Стандарт_3	6	RealQuantH	0	0	-	•	•	√ _{BK}	-	Очистить протокол
1	6	Стандарт_3	9	RealQuantH	0	0	*	*	*	√ BK	-	Отменить вействие
1	7	Стандарт_4	6	RealQuantH	0	0	-	-	-	√ BK	-	
1	8	Стандарт_4	9	RealQuantH	0	0	*	*	*	√ _{BK}	-	
2	9	Стандарт_5	6	RealQuantH	0	0	-	-	*	√ BR	-	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
2	10	Стандарт_5	8	RealQuantH	0	0	*	*	*	√ BK	-	
2	11	K-	C	RealQuantH	K-	-	*	*	*	√ _{BK}	-	B 2 10
2	12	K-	C	RealQuantH	К-	-	•	•	•	К	•	
2	13	12-3	C	RealQuantH		197	•	-	-	-	-	
2	14	12-5	0	RealQuantH		-	•	-	-	-	-	
2	15	358-1	C	RealQuantH		-	•	-	-	-	-	
2	16	650-2	C	RealQuantH		-	•	-	-	-	•	F 6 14
3	17	923-5	C	RealQuantH		-	•	-	-	-	-	C 🕧 🔟
							•	-	-	-	•	H (8) 16
_												
_												Каланолнение 23 Очистить поле мат
_												Порядок заполнения
												"Сеободное" заполнение
_												
_											-	Применить Отме
											~	

7. В открывшемся окне нажать клавишу

8. Выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «Сохранить». Прибор начнет работу.

9. Для анализа данных перейдите к пункту 5 данной инструкции.

4.4. Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе Gentier 96 4.4.1. Создание шаблона эксперимента

Запустить программу Real-time PCR System.

2. Открыть программу **Real-time PCR System**, нажать на кнопку **«File»**. В открывшемся окне выбрать **«New Experiment»**.

3. В открывшемся окне в поле «Experiment Name» ввести название шаблона

«RealQuant H3». Указать путь до папки «Templates» в дирректории программы Real-time PCR System. Нажать кнопку «New»

New Experimen	t
Experiment Name	RealQuant H3
Save Path:	C:\Users\Artem Patutin\Documents\TLPCR
	New Cancel

ВАЖНО! При отсутствии папки «**Templates**» ее необходимо создать. Для этого открыть папку **TLPCR** (раздел «**Документы** (**Documents**)», и создать в ней папку «**Templates**»

4. В разделе «Run Setting» нажать на кнопку «Add Stage», последовательно добавить этапы: «Preincubation», «3 Step Amplification».

File(E) View(V) Tool([]) Option(()) Help(H)			
2 🗎 🚔 🔜 🕵 🖼 🖻 📾 🗟			
Run Setting Sample Setting Run Monitoring			
	Stage Type	Experiment	
	Preincubation	Reaction Vo	lume: 22 τ μL
Add Stage	Reverse Transcription	Lid Heating:	105 - C 🕑 Open
	2 Step Amplification		
	3 Step Amplification	Step Mode	
	Melting	Fluorescence	e:
	Continuous Melting	Temperature	r 0 • °C
	Cooling	Time:	00:00
Stage Stage Type Cycle 1 Step	Custom Stage	Fluorescence	- • • •/ <i>0</i>
•	Add Close		
RealQuant H3			< > L)
5. Выставить	ь настройки как показа	но на скриншоте	ниже.
Fair Shart Fair Shart Shart	Sten 2		Experiment
95 °C 5.0 °C/s 95 °C	Step5		Reaction Volum
01:40 00:12			Lid Heating:
01:40 00:12 5,0 °C(s 57	*c 5.0.*c/s* 00:15		Lid Heating:
01:40 00:12 5,0 °C(s 57 00:1	1°C 5,0.36/8 00:15		Lid Heating:
01:40 00:12 5,0 °C/s 57 00:1	rc 5,0.26/s 00:15 15 ► +		Lid Heating:
01:40 00:12 5,0 °C/s 57 00:1	**C 50.56/5 00:15 15 • +		Lid Heating: Step Step Mode:
01:40 5,0 °C/s 5,0 °C/s	rrc 5,0.56/5 00:15 15 ● +		Lid Heating: Step Step Mode: Fluorescence:
01:40 00:12 5,0 °C/s 5,0 °C/s 5,0 °C/s 5,0 °C/s 5,0 °C/s	rc 50.4c/s 00:15		Lid Heating: Step Step Mode: Fluorescence: Temperature:

6. Перейти в раздел «Sample Setting». Курсором выделить поле с лунками и в графе «Sample Type» временно обозначить все занятые лунки как Unknown, выбрав в правом верхнем углу соответствующую строчку Unknown. В разделе Dye выбрать следующие красители: FAM, HEX, ROX, CY5.



R	un Setting	Sample Setting	Run Monitori	ing											
All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 ^	Property		^
A	UNK FAM HEX ROX Cys	LNK TAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	DNK HEX ROX Cys	INK FAM HEX ROX Cys	UNK FAM HEX ROX Cys	ENK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cys	UNK FAM HEX ROK Cys	EAM HEX ROX Cys	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cys	Select Test: Sample Type:	Unknown	v
в	UNK HEX ROX Cys	LNK HAM HEX ROX Cy5	UNK HAM HIDX ROX Cy5	UNK TAM TEX ROX CyS	LINK IAM HITX ROX Gy5	UNX TAM HEX ROX CyS	LNK TAM HEX ROX CyS	UNK TAM HEX ROX Cy5	LINK HAM HEX ROK Cys	UNC TAM TEX ROX Cy5	UNK HAM HEX ROX CyS	UNIC HAM HEX ROX Cy5	Sample: Dye: I FAM	Gene:	•
с	UNK EAM HEX ROX Cyp	FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	LINK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cys	ENK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNIK FAM HEX ROK Cy5	EAM HEX ROX Cy5	UNX FAM HEX ROX Cy5	UNIC FAM HEX ROX Cy5	ROX Cy5 Alexa Fluor 680	• • • • • •	v
D	HEX ROX Cy5	HEX ROX Cys	HAM HEX ROX Cy5	HAM HEX ROX Cys	HEX ROX Cy5	HAM HEX ROX Cy5	HAM HEX ROX Cys	HAM HEX ROX Cy5	HAM HEX ROX Cy5	HAM HIX ROX Cy5	HAM HEX ROX Cys	HAM HEX ROX Cy5	Standard Setting:		•
E	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX RCX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	BAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cys	FAM HEX ROX Cy5	Standard Conc.: Conc. Unit:	Auto Setting	pply
F	EAM HEX ROX Cy5	LNK HAM HICX ROX Cy5	HDX ROX Cy5	LAM HEX ROX Cy5	HAM HEX ROX Cy6	UNK HIEX ROX Cy5	LAM HEX ROX Cy5	HAM HEX ROX Cy5	UNK HEX ROK Cy5	HAM HEX ROX Cy5	HAM HEX ROX Cy5	HIX HIX ROX Cy5	Replicate Replicate No.:	▼ C	lear
G	UNK FAM HEX ROX Cy5	ENK FAM HEX ROX Cys	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cys	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cys	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cys	EAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cys	UNIK FAM HEX RCX Cy5	Reference Dye: Sample ID:	A	▼ pply
			_				Unk	nown 📕 Stand	lard 📕 Positiv	e 📕 Negative	NTC 1	NRC Control	Unique ID:	A	nolv 🖌
R	alQuant H3														< ▶ □

7. Задать сведения о калибровочных образцах. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с КО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Standard**. Обязательно задать концентрацию каждого калибровочного образца, для чего выделить A1-2 лунки, куда внесен **KO1**, в графе **Standard Conc.** вписать концентрацию **KO1** – 50, повторить тоже самое для **KO2** – 5, **KO3** – 0,5, **KO4** – 0,05, **KO5** – 0,005. Лунки **F1-2** –**OKO**. Выделить лунки, в которых находится пробирки с **OKO**, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Negative**. Остальные образцы оставить **Unknown**.

F	Run Setting	Sample Setting	Run Monitori	ng										
A	STD 5,000E+01 5,000E+01 5,000E+01 5,000E+01	STD S,000E+01 S,000E+01 S,000E+01 S,000E+01	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX KOX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	Property Select Test: Sample Type:	Standard
в	STD 5,000E+00 5,000E+00 5,000E+00 5,000E+00	STD 5,000E+00 5,000E+00 5,000E+00 5,000E+00	UNK FAM HEX ROX CyS	UNK FAM HEX ROX Cys	UNX FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX CyS	UNK FAM HEX ROX CyS	UNK FAM HEX ROX Cys	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX CyS	UNK FAM HEX ROX Cys	UNK HAM HEX ROX Cy5	Sample: Dye: FAM	Unknown Standard Positive
с	\$10 \$,000E-01 \$,000E-01 \$,000E-01 \$,000E-01	\$10 \$,000E-01 \$,000F-01 \$,000E-01 \$,000E-01	EAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX CyS	UNX FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX CyS	EAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	 ✓ HEX ✓ ROX ✓ Cy5 	Negative NTC NRC
D	5,000E-02 5,000E-02 5,000E-02 5,000E-02 5,000E-02	\$10 \$,000E-02 \$,000F-02 \$,000E-02 \$,000E-02	EAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX CyS	EAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX CyS	EAM HEX ROX Cy5	Alexa Fluor 680	
E	\$10 \$000E-03 \$000E-03 \$000E-03 \$000F-03	STD 5,000E-03 5,000E-03 5,000F-03 5,000F-03	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cys	EAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cys	EAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	Dye: Standard Conc.: Conc. Unit:	All
F	NEG FAM HEX ROX Cy5	NEG FAM HEX ROX Cy5	UNK FAM HEX ROX Cy5	Replicate Replicate No.:	Auto Setting									
G	FAM HLX ROX CyS	FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX CyS	EAM HEX ROX CyS	FAM HLX ROX Gy5	FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX CyS	FAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	EAM HEX ROX Cy5	FAM HEX ROX CyS	FAM HLX ROX Cy5	Reference Dye:	Auto Setting
	ÚNK EAM	ÜNK.	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK UNK Unki	nown Stand	lard Positiv	e Negative		IRC Control	Unique ID:	Apply

8. Нажать на вкладку «File», выбрать «Save as» и сохранить шаблон в папке «Templates».



File(F) View(V) T	fool(T) Option	(O) Help(H)													
	New Experime	ent(N)	C	trl+N		1										
	New Experime	ent From Test Te	mplate			9										
	New Experime	ent From Existin	g Experiment													
	Open Data Fil	le	c	trl+O	4	5	6	7	8	9	10	11	12 ^	Property		
	Recent Files			+ i	The second se	M	FAM	EAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	Select Test:		•
	Close Experim	nent			R	ox	ROX	ROX	ROX	ROX	ROX	ROX	ROX	Sample Tupe:	Standard	
	Save		C	trl+S	9	<i>y</i> >	cys	Cyp	Cyp	Cyp	Clo	cys	Cy5	bumple type:	Standard	
	Save As		C	trl+A	NK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	Sample:		•
	Export Raw D	ata			Н	EX	HEX	HEX	HEX	HEX	HEX	HEX	HEX	Dye:	Gene:	
	Export All Dat	ta Sheets to Exce	1		Q.	yS	KUX Cy5	KOX Cy5	Cy5	Cy5	Cy5	NOX Cy5	KUX Cy5	FAM	T	•
	Report Manag	ger												HEX	T	
	Exit				NK E/	UNK M	UNK FAM	UNK FAM	UNK FAM	UNK FAM	EAM	UNK FAM	FAM			
С	5,0001-01	5,0001-01	ROX	ROX	R	EX DX	ROX	HEX ROX	ROX	ROX	ROX	ROX	ROX	V ROA		-
	5,000E-01	5,000E-01	Cy5	Cj6	Q	y5	CyS	Cy5	Cy5	Cy5	Cy5	Cy5	Cys	✓ Cy5	▼	V
	STD	STD	UNK	U	NK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	Alexa Fluor 680	> ▼	V
	5,000E-02 5,000E-02	5,000E-02 5,000E-02	FAM	FAM	67 11	MM FX	EAM HEX	EAM HEX	FAM	FAM HEX	FAM	EAM HEX	EAM HEX	FRET	▼	V
D	5,000E-02 5,000E-02	5,000E-02 5,000E-02	ROX Cy5	Cy5	RI C	DX y5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	Standard Setting:		
														Dye:	All	V
	STD 5,000E 03	STD 5,000E-03	UNK FAM	EAM	NK E/	UNK M	UNK	UNK FAM	UNK FAM	UNK FAM	UNK FAM	UNK	UNK FAM	Standard Conc.:	50	
Е	5,000E-03 5,000E-03	5,000E-03 5,000E-03	HEX ROX	HEX ROX	H	EX OX	HEX ROX	HEX ROX	HEX ROX	HEX ROX	HEX ROX	HEX ROX	HEX ROX	Cons Unit		Annhu
	5,000E-03	5,000E-03	Cy5	Cy5	9	yS	CyS	CyS	Cy5	Cy5	CyS	CyS	CyS	conc. onit.	io/iii	Арріу
	NÉG	NEG	UNK	u	NK	UNK	UNK	UNK	LINK	UNK	UNK	UNK	UNK		Auto Setting	
	FAM HEX	FAM HEX	FAM HEX	FAM HEX	F/ H	AM EX	FAM HEX	FAM HEX	FAM HEX	FAM HEX	FAM HEX	FAM HEX	FAM HEX	Replicate		
F	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	R	OX yS	ROX CyS	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	ROX Cy5	Replicate No.:	▼	Clear
															Auto Setting	
	UNK FAM	UNK FAM	UNK FAM	EAM	NK EF	UNK	UNK FAM	UNK FAM	UNK FAM	UNK	UNK	UNK FAM	UNK FAM			
G	ROX	ROX	ROX	ROX	H	EX OX	HEX ROX	HEX ROX	ROX	HEX ROX	ROX	ROX	HEX ROX	Reference Dye:		_
	CyS	CyS	Cy5	Cy5	9	y5	CyS	CyS	Cy5	Cy5	Cy5	CyS	CyS	Sample ID:		Apply
								Llokr	Channel Channel	nad Danitin	Needing	NTC N	IRC Control			



5. АНАЛИЗ ДАННЫХ

5.1. Обработка результатов работы прибора АНК

1. Открыть файл данных в программе **ANK Shell**. Для этого в программе **«ANK Shell»** нажать **«Просмотр файлов данных»** и открыть файл с результатами исследования, выбрав его в папке соответствующего прибора.

2. При использовании шаблонов «**RQ**» или «**RQ-F**» кликнуть по надписи "Калибровка" в правом нижнем углу.



3. Убедиться, что параметры калибровочной прямой соответствуют требуемым значениям по каждому каналу ($\mathbb{R}^2 > 0.99$; $\mathbb{E} \ge 95\%$). Если параметры калибровочной прямой соответствуют критериям, перейти к п.4.

ВНИМАНИЕ!!! Если параметры калибровочной прямой не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными КО. Если параметры калибровочной прямой снова не будут соответствовать требуемым значениям, калибраторы приготовить новые И провести ПЦР-РВ. Использовать для количественного анализа калибровочную прямую параметрами, С не соответствующим требуемым критериям, ЗАПРЕЩЕНО!

4. Перейти на вкладку "**ХҮ** Детект" в раздел "Вывод" (слева внизу). Слева в таблице появятся значения концентраций **ИО** по каналу **FAM** (концентрация ДНК в исследуемых образцах определяется по короткому фрагменту).

RealQuant H3





5. Перейти в раздел "Результаты" (слева внизу) для оценки степени деградации ДНК в исследуемом образце. Степень деградации определяется по соотношению концентраций ДНК, полученных по короткому (канал FAM) и длинному (канал R6G) фрагментам.



6. Сформировать отчет. Для этого сверху нажать вкладку "Отчет" и в выпавшем списке выбрать "Отчет".



O U	89	🛛 Экс	nept "2019_12_11_15_31_	RealQuan	t.dank"	[RealQuant] (A	NK-48 NP[011809	D													- 0																																																								
Normal Medipatarian Contr Contr< Contr< Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Contr<<th>Cont</th></th></th>	Contr< <th>Contr<<th>Cont</th></th>	Contr< <th>Cont</th>	Cont	Φ,	Файл	і График Таблица	Отчет	Pex	им Вид Сг	равка			_											
Unit Direct Col <	4	Tat	блица Информация		оздан с	THET		+ ×	График										_																																																										
In Oncease Parto Name The State Name Name <td></td> <td></td> <td></td> <td><u>a</u> 0</td> <td>тчет</td> <td></td> <td></td> <td>🎟 💵 🗉</td> <td></td> <td>≌ .</td> <td>⊾ ⊻</td>				<u>a</u> 0	тчет			🎟 💵 🗉												≌ .	⊾ ⊻																																																								
N A NO1 PQ D0 D0.06 9.00 9.06 9.00<	En.	Поз.	Описание	Реактор	Тип	K R6G/FAM, %	K ROX/FAM, %	K ROX/R6G, %																																																																					
No. N	A1	A1	KO1	RQ	ко	90,886	96,885	106,601	3 00												_																																																								
No. N	A2	A2	KO1	RQ	КО	99,945	93,001	93,052	2 80	0											P																																																								
M M O2 R0 N0 T/2731 N1966 7939 M M O23 R0 N0 17231 N1966 7939 M M O23 R0 N0 17235 N1966 7939 M M O23 R1 N1966 N1939 N1966 N1966 N1966 M A O3 R2 N0 N1966 N196	A3	A3	KO2	RQ	ко	102,522	107,689	105,039	2 60	0									1	7																																																									
Kit Ko	A4	A4	KO2	RQ	КО	127,251	101,661	79,890											~ /	All	100																																																								
AK K KS	AS	A5	KO3	RQ	ко	91,339	103,346	113,147	2 40									1	1	ALA																																																									
Λ Λ	AG	A6	KO3	RQ	KO	94,045	97,536	103,712	2 20	0								1	1	1962																																																									
All M OA4 NO <	A7	A7	KO4	RQ	KO	92,157	105,882	114,894	2 00	0									11	1940	1000																																																								
0 0 000<	A8	A8	KO4	RQ	KO	95,652	102,174	106,818	1.00									11	////	1110	MAGA																																																								
Bit R No.5 NO NO NO 166.07 116.67 116.67 Bit R OxO NO NO Information Information Information Bit R OxO NO Information Information Information Information Information Bit R OxO NO Information Informatio	81	81	KO5	RQ	KO	120,000	80,000	66,667	4 100									11/1		11/18																																																									
 B) B) 000 R0 000 R0 000 R1 1000 R111 10000 R1111 10000 R111 10000 R1111 10000 R1111 10000 R1111 10000 R1111 10000 R1111 10000 R111 10000 R111 10000 R111 10000 R111 10000 R111 10000 R111 10000 R1111 10000 R11111 10000 R11111 10000 R11111 10000 R11111 10000 R1111 10000 R11111 100	82	82	KO5	RQ	KO	100,000	116,667	116,667	g 1 60	0								411	11/10/		11111/19																																																								
Bit Bit OO OO <tho< td=""><td>83</td><td>B3</td><td>OKO</td><td>RQ</td><td>OKO</td><td></td><td></td><td></td><td>2 1 40</td><td>0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>11 1</td><td></td><td>4/////</td><td></td><td></td></tho<>	83	B3	OKO	RQ	OKO				2 1 40	0							11 1		4/////																																																										
B5 B6 B6 <t< td=""><td>B4</td><td>B4</td><td>ОКО</td><td>RQ</td><td>OKO</td><td></td><td></td><td></td><td>ð 1 20</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>// //</td><td>11111</td><td></td><td>an me</td></t<>	B4	B4	ОКО	RQ	OKO				ð 1 20									// //	11111		an me																																																								
86 86 96	85	85	вчерашнее выделение	RQ	NO	81,818	104.813	128.105	1 20												11/1/1																																																								
07 07 <t< td=""><td>86</td><td>B6</td><td>вчерашнее выделение</td><td>RQ</td><td>NO</td><td>98.516</td><td>113,254</td><td>114.960</td><td>1 00</td><td>0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>1 111</td><td>111</td><td>11/ 1</td><td></td><td></td></t<>	86	B6	вчерашнее выделение	RQ	NO	98.516	113,254	114.960	1 00	0							1 111	111	11/ 1																																																										
88 86 Mail restrigues-1 NO 100 1077 3.5.93 41.279 C1 C1 C4 Mail restrigues-2 NO 100 107.175 11.259 C2 C4 Mail restrigues-2 NO 100 102.129 52.298 31.433 C4 C4 C5 C4 C5 100 122.29 122.29 122.29 C5 C4 C4 C5 C5 C5 C4 C5 C4 C5	87	87	sleks повторное-1	RQ	NO	90.204	35,102	38,914	80	0								HIM		/////																																																									
C1 C1 <td< td=""><td>88</td><td>B8</td><td>sleks повторное-1</td><td>RQ</td><td>NO</td><td>86.017</td><td>35,593</td><td>41,379</td><td>60</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>111</td></td<>	88	B8	sleks повторное-1	RQ	NO	86.017	35,593	41,379	60												111																																																								
Circ Circ <t< td=""><td>C1</td><td>C1</td><td>sleks повторное-2</td><td>RQ</td><td>NO</td><td>89,211</td><td>47,665</td><td>53,430</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>11</td><td></td><td><i>¶11</i></td><td>1///</td><td></td><td>11</td></t<>	C1	C1	sleks повторное-2	RQ	NO	89,211	47,665	53,430								11		<i>¶11</i>	1///		11																																																								
C1 C1 <t< td=""><td>C2</td><td>C2</td><td>sileks повторное-2</td><td>RQ</td><td>NO</td><td>102,993</td><td>52,993</td><td>51,453</td><td>40</td><td>0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td>all the second s</td><td></td></t<>	C2	C2	sileks повторное-2	RQ	NO	102,993	52,993	51,453	40	0						11				all the second s																																																									
C4 C4 04	C3	C3	синтол повторное-1	RQ	NO	89,446	140,369	156,932	20	0					/	1 1	- 41 1 1	1/ 18	12	4_1	Z																																																								
CS CS <t< td=""><td>C4</td><td>C4</td><td>синтол повторное-1</td><td>RQ</td><td>NO</td><td>88,298</td><td>152,128</td><td>172,289</td><td></td><td>. 📂</td><td></td><td>_</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td><u>u</u></td><td></td><td></td><td></td><td></td></t<>	C4	C4	синтол повторное-1	RQ	NO	88,298	152,128	172,289		. 📂		_					<u>u</u>																																																												
CK CL S 10 15 20 25 20 25 30 35 40 D1 Perspace 0 00 95 00 95 00 95 00 95 00 35 00 35 40 D1 Perspace 00 00 95 00 95 00 95 00 95 00 35 40 D1 Perspace 00 00 95 95 00 10 95 00 95 00 95 00 95 00 95 00 95 00 95 95 10 10 23 4 5 7 86 7 86 10	C5	C5	синтол повторное-2	RQ	NO	87,755	138,265	157,558		° 드							_	-																																																											
0 0 </td <td>C6</td> <td>C6</td> <td>синтол повторное-2</td> <td>RQ</td> <td>NO</td> <td>85,961</td> <td>134,483</td> <td>156,447</td> <td></td> <td></td> <td>5</td> <td>1</td> <td>10</td> <td>15</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>25</td> <td>30</td> <td>2</td> <td>35</td> <td>40</td>	C6	C6	синтол повторное-2	RQ	NO	85,961	134,483	156,447			5	1	10	15	2	0	25	30	2	35	40																																																								
D0 D0 <thd0< th=""> D0 D0 D0<</thd0<>	D1	D1	вчерашнее выделение/100	RQ	ио	90,909	109,091	120,000								ороговь	и цикл																																																												
E1 E1 B1 B1 <td< td=""><td>D2</td><td>D2</td><td>вчерашнее выделение/100</td><td>RQ</td><td>NO</td><td>83,333</td><td>108.333</td><td>130.000</td><td>Планш</td><td>ет Ан</td><td>ализ</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>• ×</td><td></td><td>Выполне</td><td>нные мето</td><td>рды</td></td<>	D2	D2	вчерашнее выделение/100	RQ	NO	83,333	108.333	130.000	Планш	ет Ан	ализ						• ×		Выполне	нные мето	рды																																																								
E2 E3 e44 montpose-1/10 R0 100 66/67 66/67 100,000 E3 e44 e44 e5 e7 e8 e6 e7	E1	E1	sileks повторное-1/100	RQ	NO	50,000	50,000	100,000	FAM R	RG RC	X Cys								12																																																										
E1 E1 elsk normspres-2100 R0 100 50.000 50.000 50.000 50.000 100.000 50.000 100.000 50.000 100.000 50.000 100.	E2	E2	sileks повторное-1/100	RQ	NO	66.667	66,667	100.000		1	2	2		5	6	7		L.	-		<i>e</i>																																																								
E4 E4<	E3	E3	sileks повторное-2/100	RQ	NO	100.000	50.000	50.000		KO1	K01	K02	KO2	КОЗ	KO3	K04	KO4	12 1	1скодные	данные																																																									
Es Es Total Non- Total Total<	E4	E4	sileks повторное-2/100	RQ	NO	66.667	33,333	50.000	I ► A	x	x	x		z.	1		1	C 2	глаживан	\$10																																																									
66 65 00 70 70 100	E5	E5	синтол повторное-1/100	RQ	ио	60.000	120.000	200.000		RQ KOS	RQ KO5	RQ	RQ	RQ внерашне	RQ	RQ sileks	RQ sileks	127	ривязка ривязка	к нулю к максими	MV																																																								
E7 E7 <td< td=""><td>E6</td><td>E6</td><td>повторное-1/100</td><td>RQ</td><td>ИО</td><td>75,000</td><td>100,000</td><td>133,333</td><td>в</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>P</td><td>асчет пор</td><td>xonosono uv</td><td>екла</td></td<>	E6	E6	повторное-1/100	RQ	ИО	75,000	100,000	133,333	в									P	асчет пор	xonosono uv	екла																																																								
EI EL monther association 2 roto restrictions	E7	E7	повторное-2/100	RQ	NO	75,000	125,000	166,667		sileks noetgp+o	sileks noetgowo	синтол поеторно	синтол	синтол поеторно	синтол			5	алибровк Сонцентог	.a																																																									
FI FA Programssandaust 1 PA 100 191547 120,000 141,818 FI Programssandaust 1 PA 100 191547 120,316 131,816 FI Programssandaust 1 PA 100 191,517 112,000 FI Programssandaust 2 PA 100 191,316 102,237 112,000 FI Programssandaust 2 PA 100 101,330 122,018 113,457 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	E8	E8	повторное-2/100	RQ	NO	75.000	150.000	200.000	۲ <u>۲</u>	RQ	RO	RQ	RQ	RQ	RO		*	20	ффектие	ность																																																									
R2 R2 moregregation streament R0 M0 92.913 T20.346 150.156 Image: Streament and	F1	F1	повторная элюция-1	RQ	NO	91,667	130,000	141,818		вчерацие	вчерашне							🔚 C	крининг																																																										
12 ΓΛ Γ	F2	F2	повторная элюция-1	RQ	NO	92,913	128,346	138,136	D	-	-	*	*	*	36	36	×	1 🖀 🗡	Ү Детект																																																										
If a final metroperation associated 2 NO NO 100.2018 113.675 E maggin ma	F3	F3	повторная элюция-2	RQ	NO	88,136	104.237	118.269		sieks	sileks	sieks	sileks	OWNTOIN	CUNTON	синтол	CHARTON																																																												
< < >>>>	F4	F4	повторная элюция-2	RQ	NO	107.339	122.018	113.675	E	nostopeo	повторно	nostopeo	повторно	108100+0	повторно	108300+0	повторно																																																												
ke Bedoa Pegyanar										RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ																																																												
Bur Burog Pesymetat	<	<						>		- controp ing	- Controped	100-0040	- Controping				v	1																																																											
	Выя	Вывод	Результат						 ✓ ✓ 			\bowtie					× 8																																																												

5.2. Обработка результатов работы прибораСFX96

5. Открыть файл в программе «Bio-Rad CFX Manager». Для этого в меню File выбрать Open→Data File, найти обрабатываемый файл и открыть его.

6. Установить расчет результатов анализа методом **Regression**. Для этого в меню **Settings** выбрать **Cq Determination Mode** \rightarrow **Regression**.

7. Оценить стандарты (St) КО1- КО5 и калибровочную прямую по каналам FAM, HEX, ROX. Убедиться, что параметры калибровочной прямой соответствуют допустимым значениям по каждому каналу ($\mathbb{R}^2 > 0.99$; $\mathbb{E} \ge 95\%$).

8. Включить BCE образцы и контроли, перейти в окно Quantification Data и открыть таблицу Results. Для корректного отображения количественного результата в Reports нажать 1 раз Content, 3 раза Well. Образцы должны стоять по порядку, начиная со стандартов, дубли образцов должны стоять друг за другом, флуорофоры должны стоять в порядке FAM, HEX, ROX, Cy5 для каждого образца.

9. В таблице результатов **Results** оценить значения в столбце **Starting Quantity (SQ)**по каждому каналу (**FAM**, **HEX**, **ROX**) для каждого исследуемого образца в соответствии с п.6 Интерпретация результатов.

5.3. Обработка результатов работы прибора Dt-prime/Dt-lait 5.3.1. Анализ данных

1. Открыть файл данных с помощью программы **RealTime PCR**

2. Убедиться, что в строке «Метод» отмеченно «Пороговый Сt» и кликнуть по иконке настроек.



RealQuant H3



3. В появившемся списке выбрать последний пункт и указать метод «Мультиплекс».



4. В правом верхнем углу выбрать «Количественный»

RealQuant H3



х х х х Протокол	нализ оптически:	кизмерений							-	RealTime	_PCF
ротокол: О	Оператор: Гос	ть Дат	а: 28 Июнь 2022, 17:02	2:47	Резу	льтаты					
ментарий:				0			Мульти	плекс			
							Мульт	иплекс			
пы: Ве	ealQuant H3 🗸 🗸	📂 🔻 🔒 🗎 💆	🇱 🚺 🖉 🎬	()			Kauecz	 BOUULIIÄ			
							Количес	твенны	й		
од: Пор	оговый (Ct)		Fam	~			Относи	тельный	ň		
00 -					C1	Стандарт_2	19,4	18,7	21,3	24,5	
				+00	D1	Стандарт_2	19,9	18,9	21,6	24,8	
0				* <u>i</u>	E1	Стандарт_3	22,9	22,1	24,9	24,6	
				MC	F1	Стандарт_3	22,8	21,8	24,9	24,3	
p -				1≘	G1	Стандарт_4	26,4	25,3	28,3	24,6	
		IIII		-	H1	Стандарт_4	26,5	25,6	28,6	24,9	
0-		11 IXA			A2	Стандарт_5	30,3	29,3	32,4	25,0	
					B2	Стандарт_5	30,1	29,4	32,0	24,8	
0		1 11/11	1/		C2	K-	36,1	35,1		24,5	
					D2	K-	37,3			24,8	
0					E2	12-3	18,2	16,9	19,8	24,8	
					F2	12-3	18,2	17,1	20,0	24,9	
0-					G2	35-8	18,1	16,8	19,5	25,0	
					H2	35-8	18,2	17,1	19,9	25,2	
~											
Threshold (9,4)											
5 1	0 15 20	25 30	35 40								
	Номер ці	икла									
Auto	On x=45.3 y=298	Log Y	📥 Пиния 🚔 М	аркер	H	Режимы просмо	тра дан	ных			

5. Кликнуть по иконке и выбрать «показать график Стандартная кривая»



СИНТО

6. Убедиться, что параметры калибровочной прямой соответствуют требуемым значениям ($R^2 > 0.99$; $E \ge 90\%$) по каналам FAM, HEX, ROX.



ВНИМАНИЕ!!! Если параметры калибровочной прямой не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными КО. Если параметры калибровочной прямой снова не будут соответствовать требуемым значениям, провести приготовить новые калибраторы И ПЦР-РВ. Использовать для количественного анализа калибровочную прямую параметрами, С не соответствующим требуемым критериям, ЗАПРЕЩЕНО!

7. Нажать на иконку «Отчет»

🛃 Архив test280622.r96	5							- 0	×
Режим Настройки Г	Томощь								
ала и на	Ст=.,///// Анализ оптических изме	ерений						🔯 RealTime_	PCR
Протокол: 0	Оператор: Гость	Дата:	28 Июнь 2022, 17:02:47	Pesy	льтаты	Дополнитель	ные станда	арты	
Комментарий:			Ċ			Количес	ственный		~
Тесты:	RealQuant H3 🗸 🎽	; - , <mark></mark> 2	🇱 👔 🕴 🗱 🚳	N≌	Иден	тификатор	Ct	Результат	^
Метод:	Пороговый (Ct)	Отчет	● Pam ✓	Δ1	CT.	1	16,1 15,2 18 1	50,0 50,0 50,0	

8. Проанализировать полученные результаты

5.3.2. Автоматическая оценка результатов полученных на амплификаторе Dtprime/Dt-lait

1. Убедиться, что в строке «Тип анализа» отмечено «Мультиплекс» и выбрано Количественное отображение результатов анализа (см. п. 5.3. пп. 3-4).

RealQuant H3

БСИНТО

2. Кликнуть правой кнопкой мыши по любому участку таблицы и выбрать пункт «Копируем содержимое таблицы в ClipBoard».



- 3. Открыть файл «Шаблон rQ для расчета разведения и деградации» для DT-prime.
- 4. Скопировать данные из файла экспорта на лист шаблона «Данные rQ».

	A	В	С	D	E	G	н	1	J	ĸ
1	Название образца	Ct (FAM)	Ct (HEX)	Ct (ROX)	Ct (CY5)	Small Autosomal	Large Autosomal	Y		
2	Стандарт_1	18,70	15,40	18,90	26,20	50,00	50,00	50,00	-	-
з	Стандарт_1	18,50	15,30	18,70	25,80	50,00	50,00	50,00	-	-
4	Стандарт_2	22,50	19,20	22,50	26,10	5,00	5,00	5,00	-	-
5	Стандарт_2	21,90	19,30	22,60	26,10	5,00	5,00	5,00	-	-
6	Стандарт_3	25,60	22,60	26,10	25,80	0,50	0,50	0,50	-	-
7	Стандарт_3	25,00	22,50	25,80	25,90	0,50	0,50	0,50	-	-
8	Стандарт_4	28,50	25,80	29,30	25,30	0,05	0,05	0,05	-	-
9	Стандарт_4	29,10	26,30	29,60	25,90	0,05	0,05	0,05	-	-
10	Стандарт_5	32,90	30,20	33,20	26,00	0,01	0,01	0,01	-	-
11	Стандарт_5	32,50	29,50	32,40	25,80	0,01	0,01	0,01	-	-
12	К-	39,20			25,70	0,00		-	-	-
13	К-	38,30	36,30		25,70	0,00	0,00	-	-	-
14	1	18,40	15,20	18,60	25,90	58,20	57,60	60,60	-	-
15	2	18,50	15,30	18,80	26,10	52,40	57,10	55,40	-	-
16	3	21,90	19,00	22,40	25,80	5,70	5,20	5,00	-	-
17	4	21,70	19,10	22,30	26,00	6,30	4,80	5,20	-	-
18	5	25,70	22,30	25,80	25,70	0,46	0,60	0,52	-	-
19	6	25,10	22,60	25,80	25,70	0,66	0,52	0,55	-	-
20	7	28,70	26,10	29,30	25,50	0,06	0,05	0,05	-	-
21	8	28,50	26,10	29,10	25,40	0,07	0,05	0,06	-	-
22	9	32,20	29,30	32,80	25,70	0,01	0,01	0,01	-	-
23	10	32,10	29,40	32,20	25,60	0,01	0,01	0,01	-	-
24	11	18,10	15,30	18,70	25,30	69,10	56,80	58,70	-	-
25	12	18,40	15,30	18,70	26,10	54,70	56,80	58,10	-	-
26	13	21,80	19,10	22,10	25,60	5,80	4,80	5,90	-	-
27	14	22,00	19,20	22,40	25,80	5,10	4,50	5,10	-	-
28	15	25,30	22,60	26,00	25,60	0,59	0,51	0,45	-	-
29	16	25,20	22,60	25,80	25,80	0,64	0,49	0,52	-	-
30	17	28,60	25,90	29,30	25,60	0,07	0,06	0,05	-	-
31	18	28,60	25,80	29,20	25,40	0,07	0,07	0,06	-	-
32	19	32,00	29,50	32,70	25,40	0,01	0,01	0,01	-	-
33	20	32,10	29,30	32,40	25,80	0,01	0,01	0,01	-	-
34										
35										
36										
37										
38										
	🗸 → Данны	e rQ Pa	азведение и	Деградация	a (+)			1	

5. Данные загрузятся в шаблон, который автоматически произведет расчет степени деградации и необходимого разведения образцов. Результаты расчета содержатся на листе **«Разведение и деградация»**. Для просмотра расчетных данных разведения и деградации кликнуть на лист **«Разведение и Деградация»**.



	А	В	С	D	G	l	J		
1	Разведение препаратов ДНК до рабочей концентрации.								
2	Система «AmpF/STR® GlobalFiler™ PCR Amplification Kit».								
4	Sample	С ДНК исх нг/мкл 🔻	С ДНК раб нг/мк/ т	Разведение общее	V исх ДНК мкл	Разведение I	Деградация		
5	A	В	С	D = B/C	G	1			
18	1	58,2	0,0670	869	5,00	1 (DNA) + 868 (H2O)	1,01041667		
19	2	52,4	0,0670	782	5,00	1 (DNA) + 781 (H2O)	0,91768827		
20	3	5,7	0,0670	85	5,00	5 (DNA) + 420 (H2O)	1,09615385		
21	4	6,3	0,0670	94	5,00	5 (DNA) + 465 (H2O)	1,3125		
22	5	0,459	0,0670	7	5,00	5 (DNA) + 29 (H2O)	0,76245847		
23	6	0,661	0,0670	10	5,00	5 (DNA) + 44 (H2O)	1,27852998		
24	7	0,061	0,0670	н/р	5,00	н/р	1,12962963		
25	8	0,069	0,0670	н/р	5,00	н/р	1,32692308		
26	9	0,006	0,0670	н/р	5,00	н/р	0,85714286		
27	10	0,006	0,0670	н/р	5,00	н/р	1		
28	11	69,1	0,0670	1031	5,00	1 (DNA) + 1030 (H2O)	1,2165493		
29	12	54,7	0,0670	816	5,00	1 (DNA) + 815 (H2O)	0,96302817		
30	13	5,8	0,0670	87	5,00	5 (DNA) + 428 (H2O)	1,20833333		
31	14	5,1	0,0670	76	5,00	5 (DNA) + 376 (H2O)	1,13333333		
32	15	0,586	0,0670	9	5,00	5 (DNA) + 39 (H2O)	1,15581854		
33	16	0,637	0,0670	10	5,00	5 (DNA) + 43 (H2O)	1,28947368		
34	17	0,065	0,0670	н/р	5,00	н/р	1,10169492		
35	18	0,067	0,0670	н/р	5,00	н/р	1,01515152		
36	19	0,007	0,0670	н/р	5,00	н/р	1,16666667		
37	20	0,006	0,0670	н/р	5,00	н/р	0,85714286		
38	0	0	0,0670	н/р	5,00	н/р			
39	0	0	0,0670	н/р	5,00	н/р			
	✓ Данные гQ Разведение и Деградация ⊕								

ПРИМЕЧАНИЕ! При отсутствии программы **Microsoft Excel** на компьютере, подключенном к DT-prime, данные можно скопировать в программу **Блокнот** и сохранить файл в формате **txt** для дальнейших расчетов с помощью **Шаблона rQ**.



6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице.

	Результат ПЦР-РВ по мишени				Интерпретация результата			
Образец	<u>FAM</u>	HEX		Cy5				
I		aL	I					
ļ,	Результаты все	его анализа не п	одлежат учету в	в любом из сле,	дующих случаев			
St	St Нет кривой амплификации по любой из мишеней				ПЦР-РВ прошла не корректно, проблемы с реагентами или амплификатором			
NC	Нет	кривой амплифика	ции	Нет кривой амплификации	ПЦР-РВ прошла не корректно, проблемы с реагентами или амплификатором			
NC	Есть кривая ампл	пификации ранее 35	цикла (Ст ≤35,0)	Есть/нет кривой амплификации	Контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ			
	Результ	аты анализа не	подлежат учёту	для конкретн	ой пробы			
	Нет	скривой амплифика	ции	Нет кривой амплификации				
Unknown	Нет Есть кривая ампл	кривой амплифика иификации после 35	ции/ цикла (Ст > 35,0)	Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	Ингибирование ПЦР-РВ			
	Есть кривая ампли цикла (С	фикации после 35 Ст > 35,0)	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ст≤ 35,0)	Есть/нет кривой амплификации	Ложноположительный результат			
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих данных								
St	Ect	гь кривая амплифика	ации	Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (Ст ≤ Стмс+2)	Набор реагентов специфичен в отношении ДНК человека. Подтверждение работоспособности смеси, результаты подлежат учету.			
NC	Нет кривой ампл	ификации/Есть кри осле 35 цикла (Ст >3	зая амплификации 35,0)	Есть кривая амплификации в диапазоне 25- 29 цикла Ст=25-29	Контаминация отсутствует			
	Есть кривая амп	лификации ранее 3:	5 цикла (Ст ≤35,0)	Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (Ст ≤ Ст NC+2)	В пробе содержится ДНК человека, ингибирование отсутствует.			
Unknown	Есть кривая амп 35 цикла	лификации ранее (Ст≤ 35,0)	Нет кривой амплификации/Ес ть кривая амплификации после 35 цикла (Ст >35,0)	Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (Ст ≤ Ст NC+2)	В пробе содержится ДНК человека женского пола			
	Деградированные образцы							
	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ст≤35,0)	Нет кривой амплификации/Е сть кривая амплификации,	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ст≤ 35,0)	Кривая амплификации	В пробе содержится деградированная ДНК человека мужского пола			



Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ст≤ 35,0)	которая отстает от кривой амплификации мишени Small Autosomal более чем на 1 цикл	Нет кривой амплификации/Е сть кривая амплификации после 35 цикла (Ст >35,0)	равна или опережает кривую амплификации NC (Ст ≤ Ст мс+2)	В пробе содержится деградированная ДНК человека женского пола	
	иторами ПЦР)			
Есть кривая амп	ллификации ранее 3.	5 цикла (Ст ≤35,0)	Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	В пробе содержится Д человека, мужского п ингибирование ПЦР-РВ	ДНК юла,
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ст≤ 35,0)		Нет кривой амплификации/Е сть кривая амплификации после 35 цикла (Ст >35,0)	Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	В пробе содержится Д человека женского п ингибирование ПЦР-РВ	ДНК юла,
Нет кривой ампл пс	ификации/Есть кри осле 35 цикла (Ст >3	вая амплификации 35,0)	Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (Ст ≤ Ст мс+2)	В пробе отсутствует Д человека.	днк

6.1. Оценка результатов анализа

Концентрация геномной ДНК определяется по короткому фрагменту аутосомной ДНК – значение aS.

Расчет степени деградации ДНК в образце осуществляется по формуле:

Концентрация мишени aS (нг/мкл) Концентрация мишени aL (нг/мкл)

Половая принадлежность определяется наличием или отсутствием амплификации фрагмента Y-хромосомы. Проанализировать значения Ct мишени Y. Наличие значений Ct≤35,0 говорит о присутствии мужской ДНК в образце, отсутствие сигнала или Ct>35,0 о женской ДНК.

Расчет соотношения мужской и женской ДНК в смесевых образцах осуществляется по формуле:

Мужская ДНК:женская ДНК =
$$\frac{Y(H\Gamma/MKЛ)}{Y(H\Gamma/MKЛ)}$$
: $\frac{(aS(H\Gamma/MKЛ)-Y(H\Gamma/MKЛ))}{Y(H\Gamma/MKЛ)}$

где Y (нг/мкл) – концентрация мишени Y, aS (нг/мкл) – концентрация мишени Small autosomal

Оценка ингибирования установить значения Ct внутреннего положительного контроля – IPC. Значения Ct для IPC исследуемых образцов не должны превышать значения Ct для IPC отрицательного контроля (NC) более чем на 2 цикла: Ct \leq Ct_{NC}+2. Получение значений, превышающих значение Ct для IPC отрицательного контроля (NC)

более чем на 2 цикла (Ct>Ct_{око}+2) будет свидетельствовать о наличии ингибиторов в образце ДНК.

Если по основным мишеням (aS, aL и Y) сигнал не детектируется, а по IPC сигнал есть, но его значение Ct>Ct_{0к0}+2, или если сигнал не детектируется ни по основным мишеням (aS, aL и Y), ни по IPC, необходимо развести образец ДНК в 5, 10 и 15 раз, а затем снова провести ПЦР-РВ для оценки степени ингибирования и концентрации ДНК.

Рекламации на набор реактивов направлять по адресу: 127434 г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495) 977-74-55, <u>syntol@syntol.ru</u>