

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.	Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблонов RQ, RQ-F (с проведением калибровки).....	9
4.1.3.	Создание и использование внутренней калибровочной кривой	11
4.2.	Программное обеспечение и проведение ПЦР-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 прибора CFX96	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
	Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице.....	36
6.1.	Оценка результатов анализа.....	37

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 TaqMan 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:

№	Мишень	Описание фрагмента	Краситель
1	aS	короткий фрагментаутосомной ДНК	FAM
2	aL	длинный фрагмент аутосомной ДНК	R6G/HEX
3	Y	ДНК Y-хромосомы	ROX
4	IPC	внутренний положительный контроль	Sy5

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 Y-хромосомы (Y) 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 калибровочной прямой, 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»

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

1.2. Область применения

Набор может быть использован в лабораториях бюро судебно-медицинских экспертиз и в 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.

2.1. Состав набора

№	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

2.2. Количество анализируемых проб

Набор HG-403p 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 (АНК 32, АНК 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, нг/мкл	Объемы	Разведение
КО1	50	ДНК человека, 50 нг/мкл	1х
КО2	5	10 мкл КО1 + 90 мкл ДНК-буфера	10х
КО3	0,5	10 мкл КО2 + 90 мкл ДНК-буфера	10х
КО4	0,05	10 мкл КО3 + 90 мкл ДНК-буфера	10х
КО5	0,005	10 мкл КО4 + 90 мкл ДНК-буфера	10х

- 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 КО3 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 суток для повторного использования.

3.2. Подготовка к проведению реакции ПЦР-РВ

1. Разморозить требуемое количество стрипованных пробирок с РС 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. Закрывать ПЦР пробирки.
4. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать 30 секунд при 3000 об·мин. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

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

Рекомендуемый порядок следования образцов в приборе АНК

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	КО1	КО1	КО2	КО2	КО3	КО3	КО4	КО4
2	КО5	КО5	ОКО	ОКО	ИО1	ИО2	ИО...	
3								
4								
5								
6								

Рекомендуемый порядок следования образцов в приборе CFX96

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КО1	КО1										
B	КО2	КО2										
C	КО3	КО3										
D	КО4	КО4										
E	КО5	КО5										
F	ОКО	ОКО										
G	ИО1	ИО...										
H	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.

Шаблоны RQ-test и RQ-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

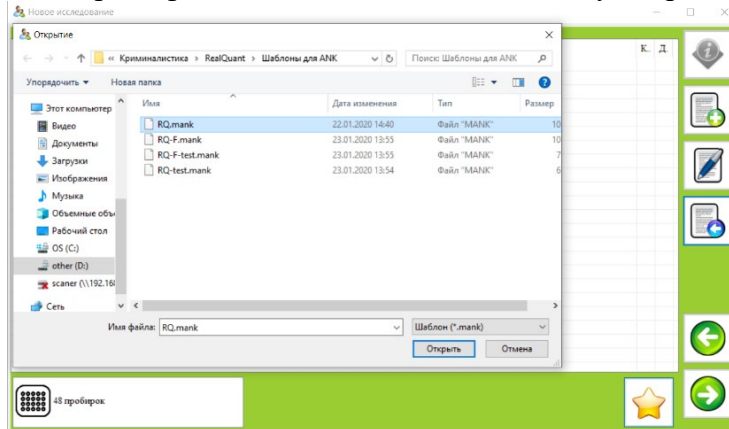
1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Для установки шаблона открыть программу ANKShell, открыть папку «Новое исследование».



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



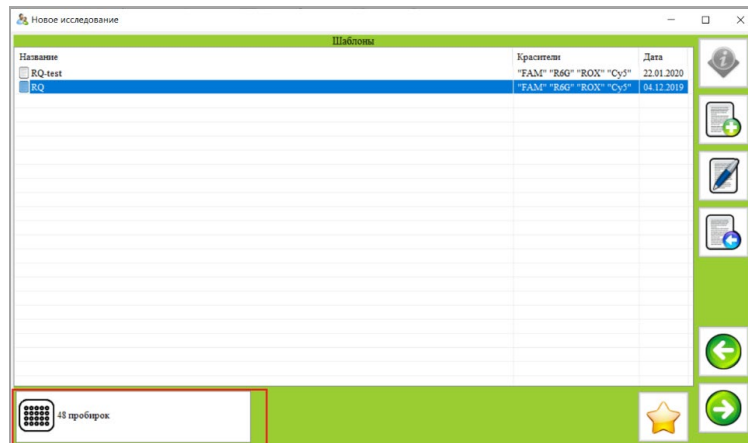
4. В проводнике выбрать файл шаблона и нажать клавишу открыть.




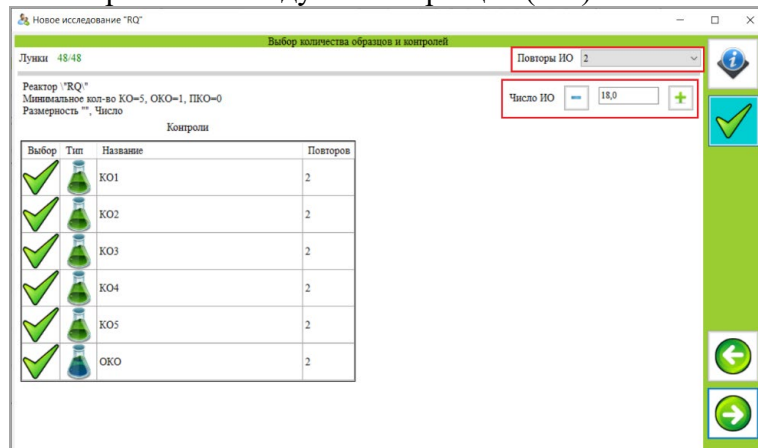
Шаблон будет установлен в программу ANKShell.

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.



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



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

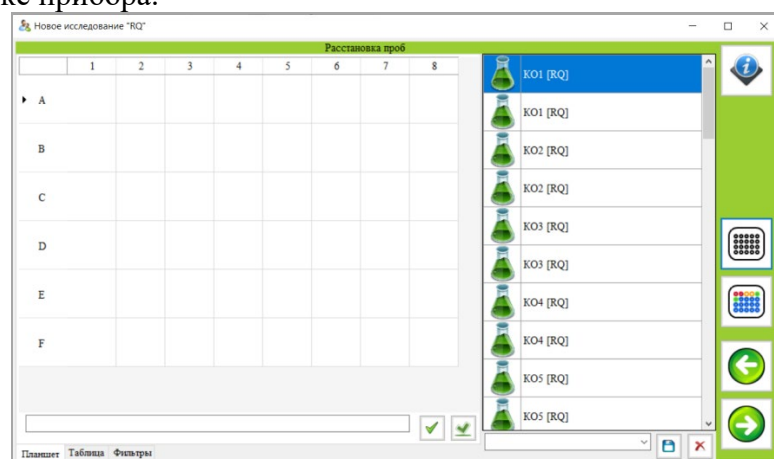
6. Внести названия исследуемых образцов.



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!

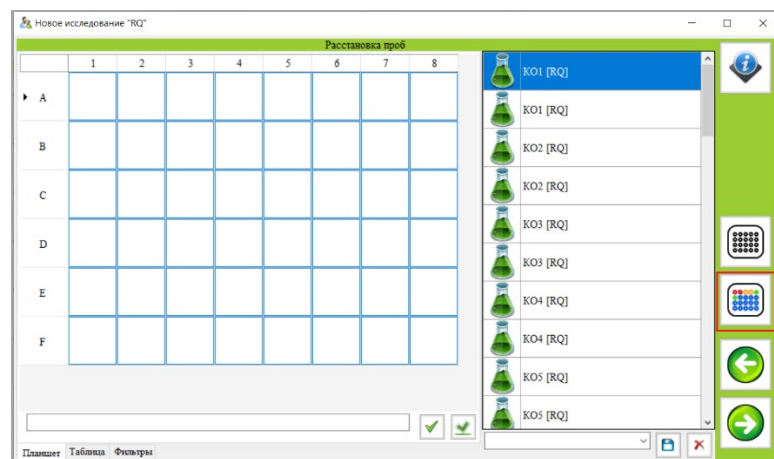
7. Нажать клавишу «Далее» в правом нижнем углу.

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




Для расстановки образцов 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 реагентов «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 кривую 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-test.

4.1.3.1 Создание внутренней калибровочной кривой

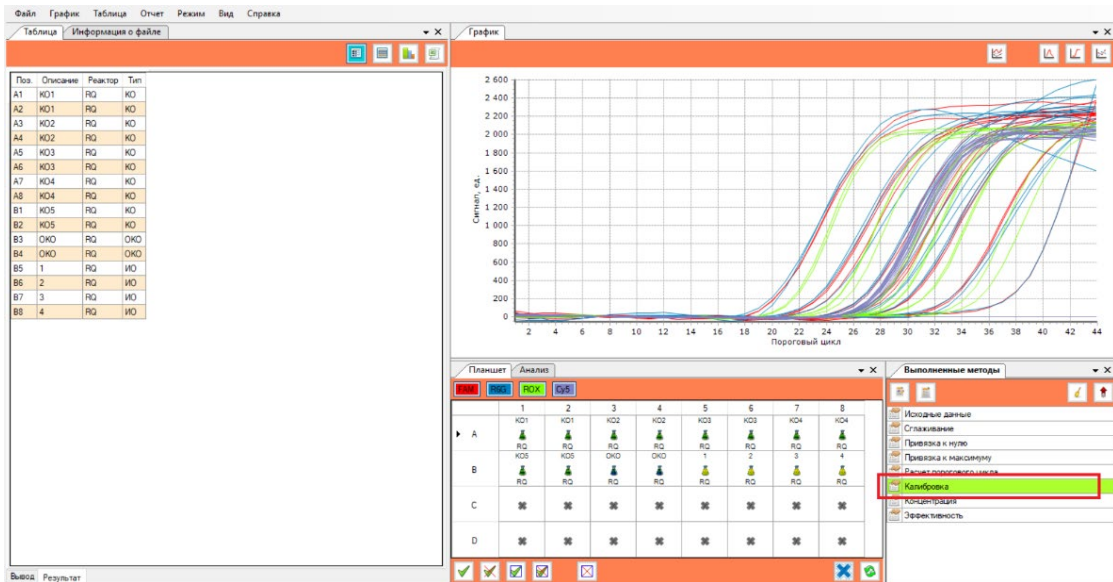
1. Используя шаблон «RQ» или «RQ-F» (в зависимости от типа амплификатора и выбранной циклограммы (быстрой или стандартной)), провести ПЦР-РВ с получением калибровочной кривой.

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».

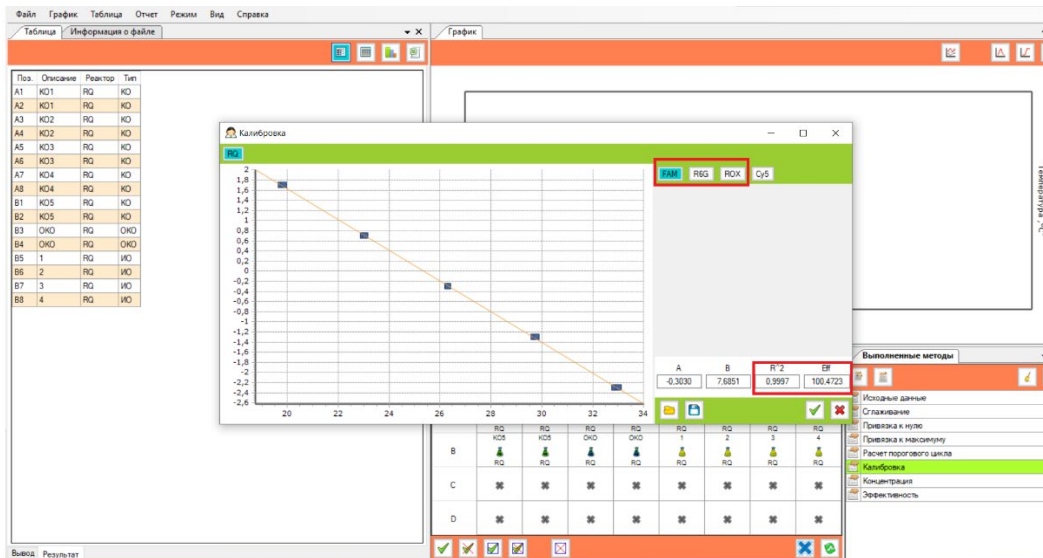
Для калибровочной прямой должны выполняться **ВСЕ** нижеперечисленные условия:

- коэффициент корреляции R^2 не ниже **0,99**;
- эффективность ПЦР **E** составляет не менее **95%**.

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

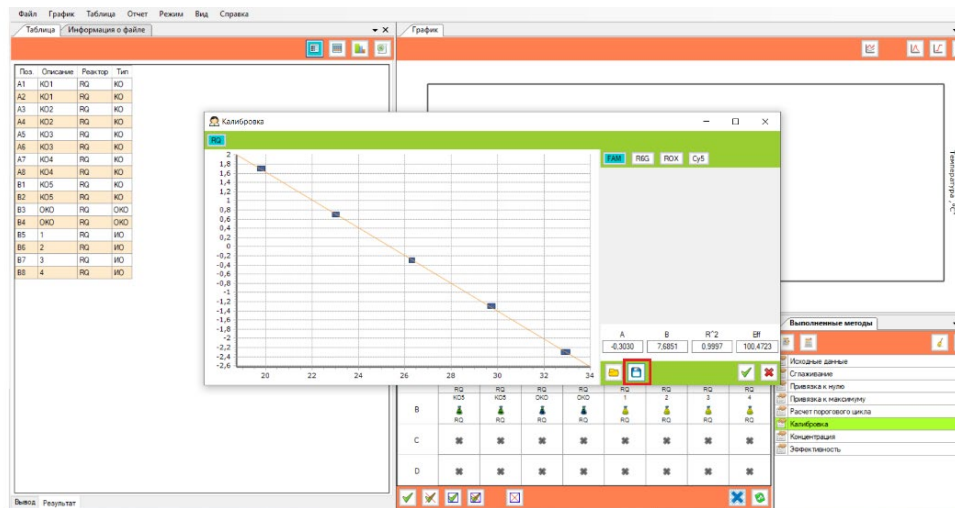


3. В открывшемся окне выбрать поочередно каждый краситель и удостовериться, что значения E и R^2 отвечают требуемым критериям.

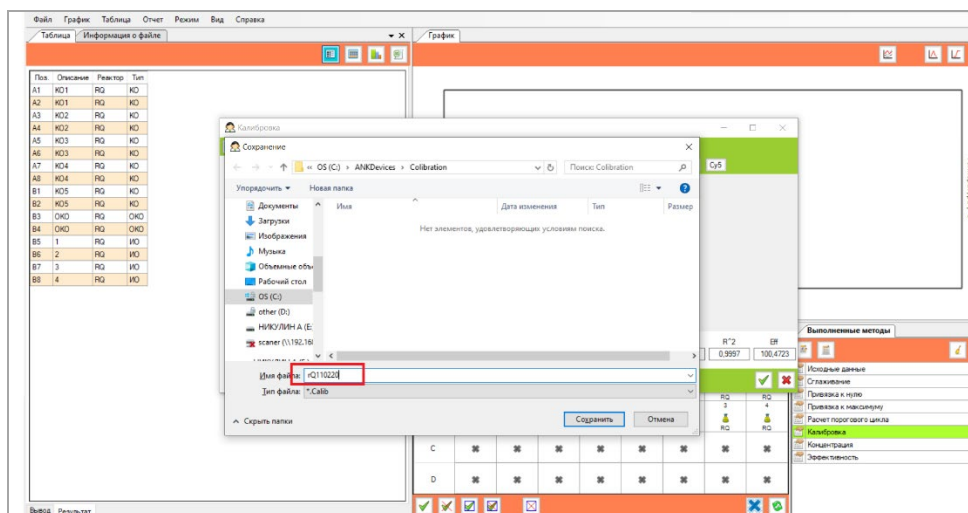


4. Если значения E и R^2 укладываются в требуемые параметры, кликнуть по иконке «Сохранить».

ВАЖНО!!! Если значения E и 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.

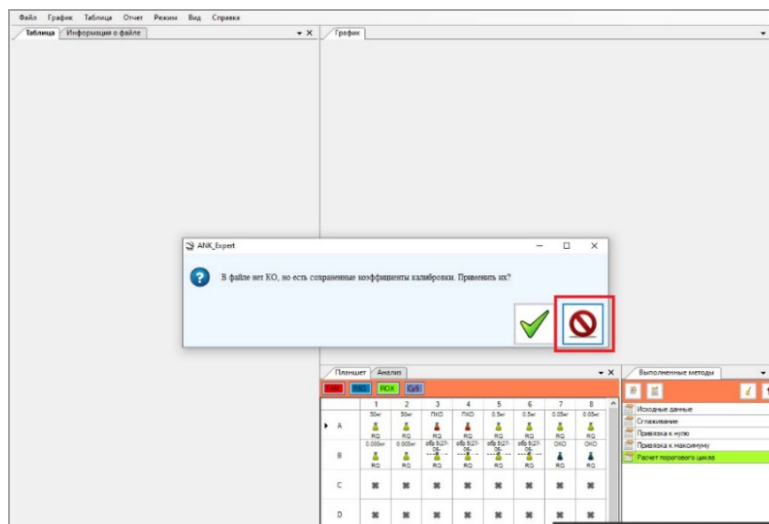


4.1.3.2 Настройка и использование внутренней калибровочной кривой

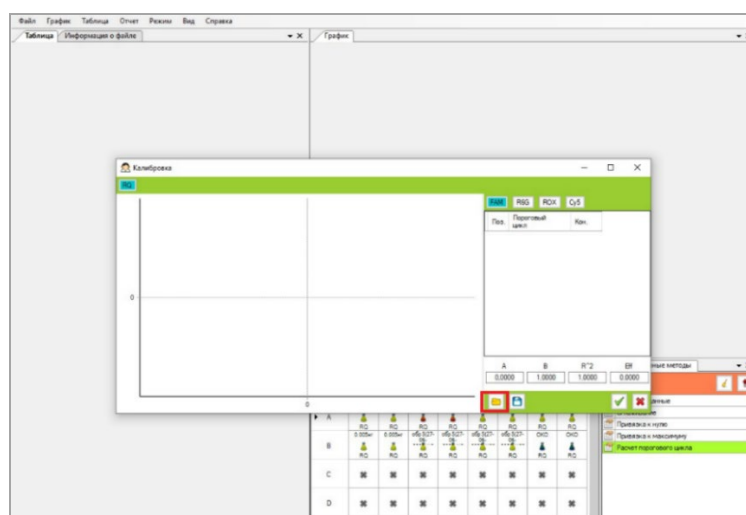
1. Для использования при расчете концентрации ДНК в исследуемых образцах внутренней калибровочной кривой необходимо, при запуске ПЦР-РВ в программе «ANK Shell», выбрать шаблон «RQ-test» или «RQ-F-test» (в зависимости от типа шаблона, который был выбран при получении калибровки).

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

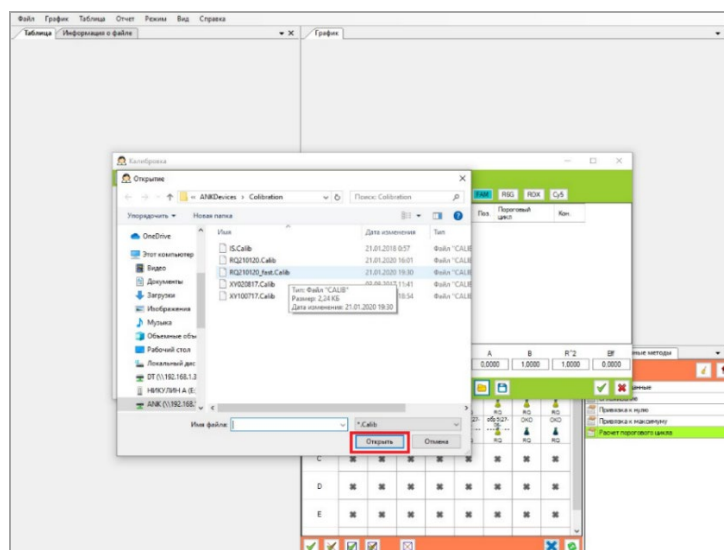
3. После прохождения ПЦР-РВ открыть файл с результатами исследования. Во время анализа данных появится окно, в котором кликнуть по правой иконке



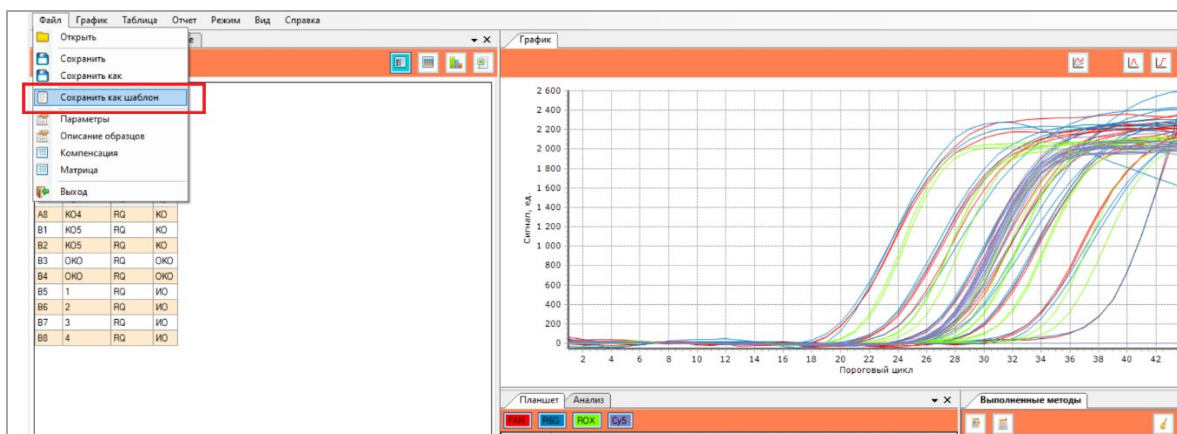
4. Во всплывшем окне кликнуть по папке «Открыть»



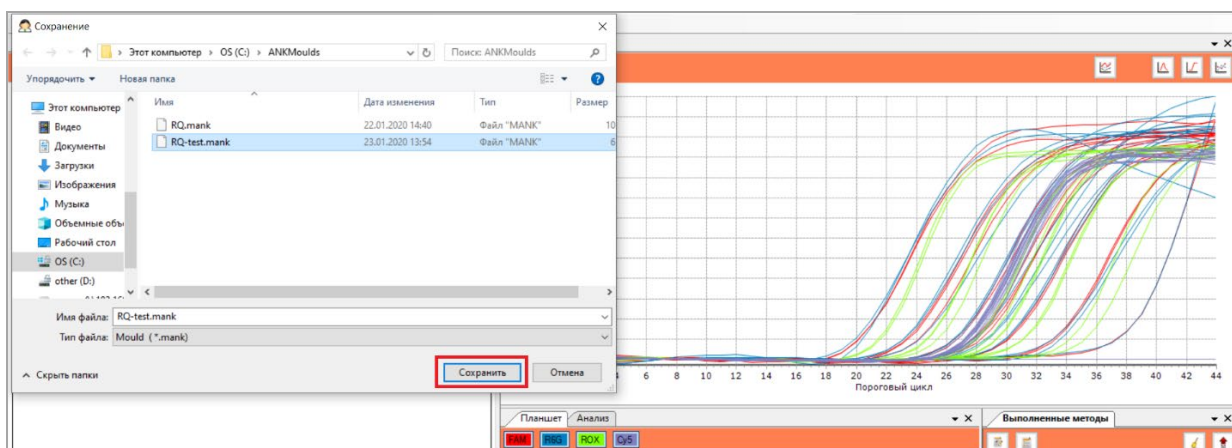
5. В окне с файлами калибровок выбрать необходимый файл и нажать «Открыть». После этого калибровка будет применена к анализируемому файлу с исследуемыми образцами.



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



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:

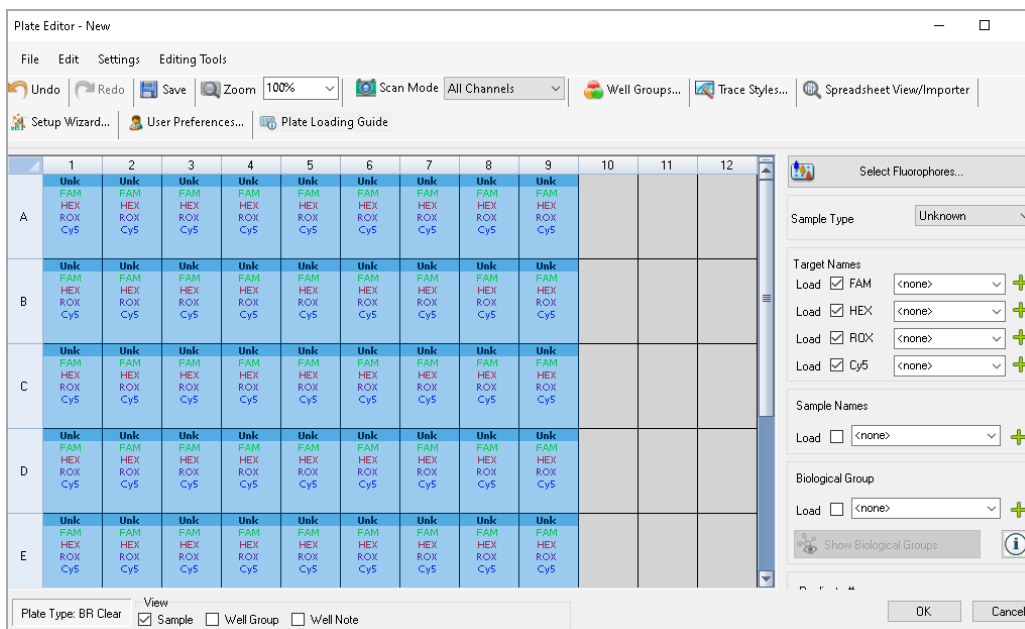
Sample Volume 25 µl

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**.

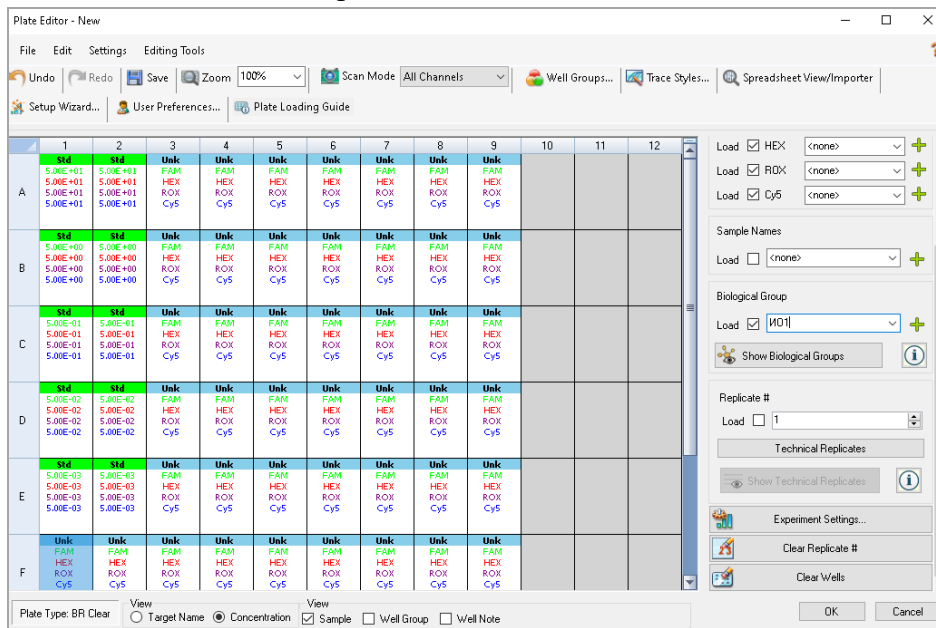
5. Нажать кнопку **Select Fluorophores**. В появившемся окне выбрать красители **FAM**, **HEX**, **ROX**, **Cy5**. Нажать **ОК**. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям: поставить «галочки» в колонке **Load** напротив названий всех выбранных красителей.



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

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



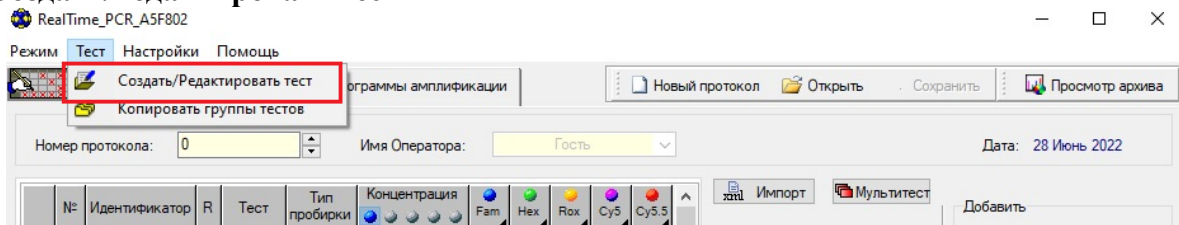
7. Нажать **ОК**. Дать имя плашке с указанием даты эксперимента и сохранить полученный файл на компьютере в удобной рабочей папке.

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.

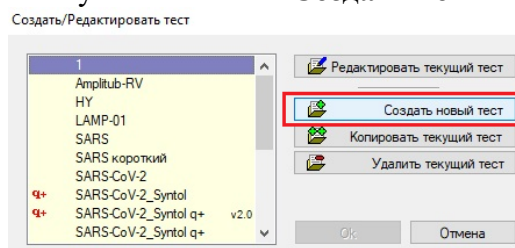
4.3. Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе Dt-prime/Dt-lite
ВНИМАНИЕ!!! Проведение ПЦР-РВ-анализа с помощью набора «RealQuantH3» на приборе Dt-prime/Dt-lite возможно только с получением калибровочной прямой при каждой постановке.

4.3.1. Создание теста (шаблона эксперимента)

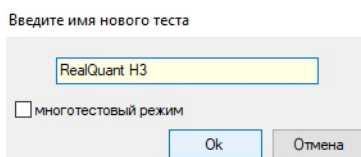
1. Открыть программу **RealTime PCR**
2. Выбрать «Тест» в верхнем меню. Из выпавшего списка нажать «Создать/Редактировать тест»



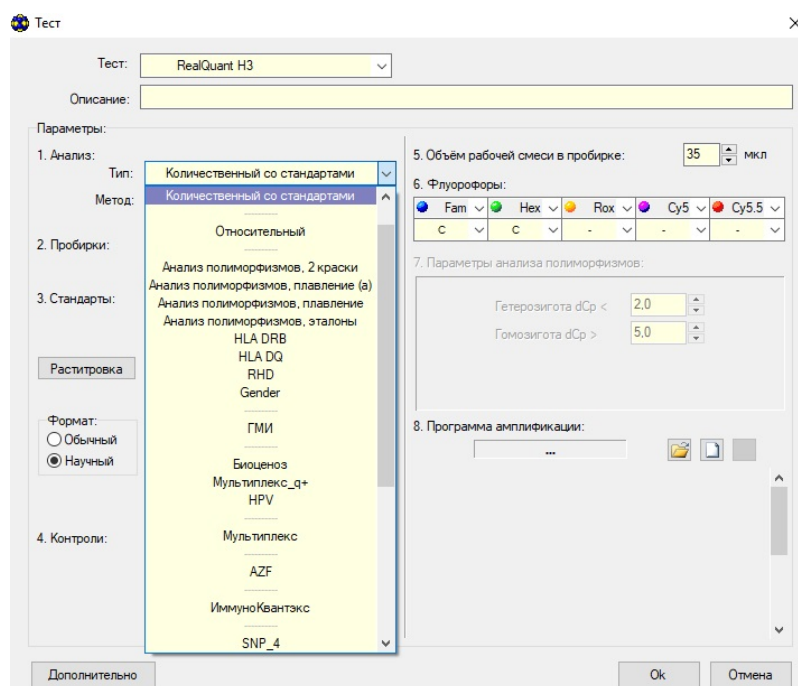
3. В открывшемся окне кликнуть по иконке «Создать новый тест»



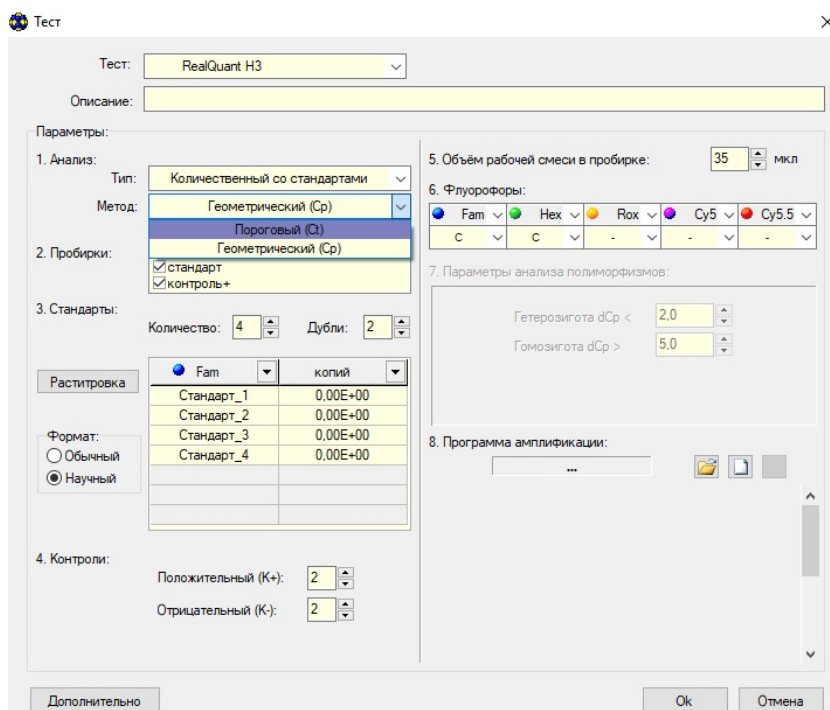
4. Ввести «RealQuantH3» в поле имени нового теста и нажать клавишу «Ok»



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



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



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

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

9. В графе каналов выбрать FAM

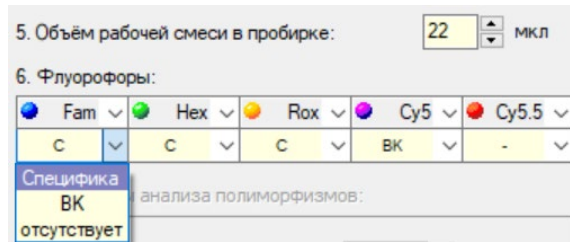
10. Установить следующие значения концентраций для стандартных образцов (контрольные образцы-КО) в графе «Копий»

Название	Концентрация 50нг/мкл
Стандарт 1 (КО1)	50
Стандарт 2 (КО2)	5
Стандарт 3 (КО3)	0,5
Стандарт 4 (КО4)	0,05
Стандарт 5 (КО5)	0,05

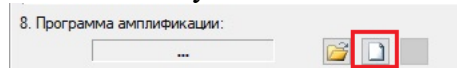
11. Такие же концентрации стандартов (КО) установить для каналов HEX и ROX

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

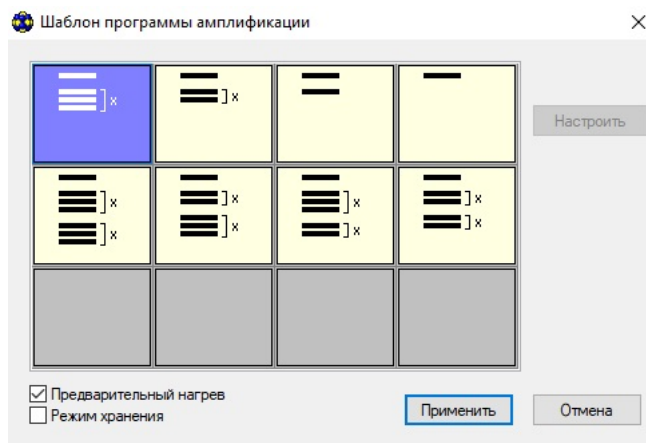
13. Установить объем рабочей смеси – 22 мкл
14. В пункте 6 «Флуорофоры» для каналов FAM, HEX, ROX выбрать «Специфика», для канала Cy5 – «ВК».



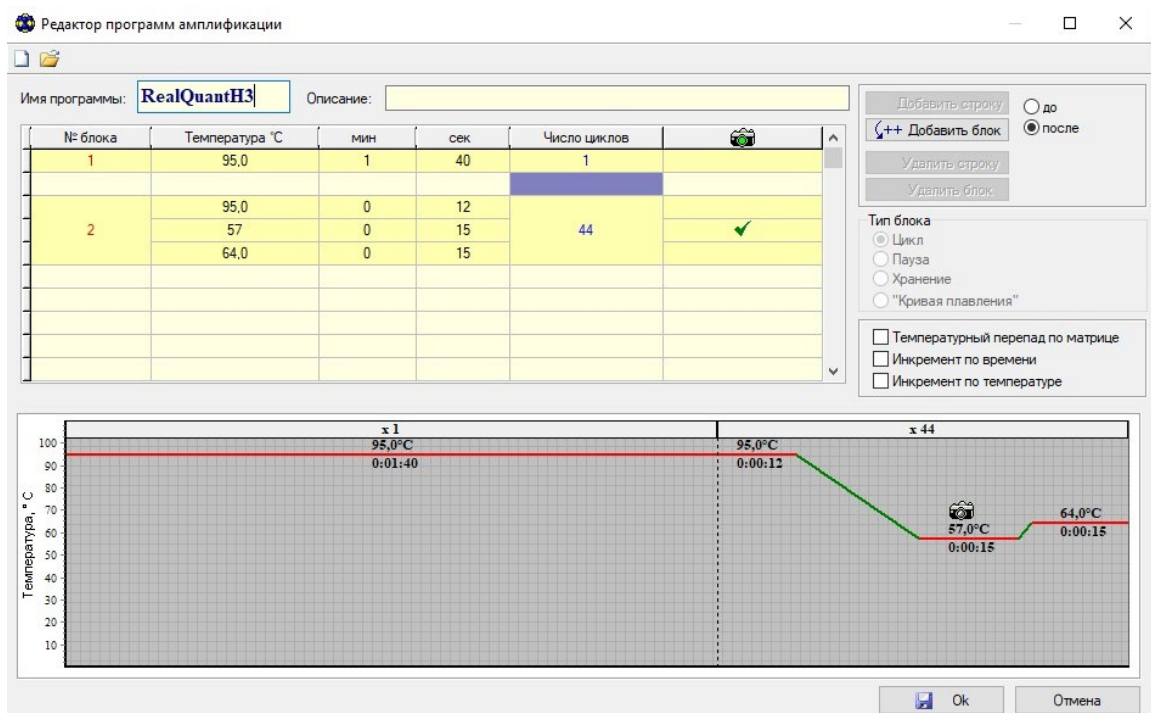
15. Создать программу амплификации кликнув по иконке.



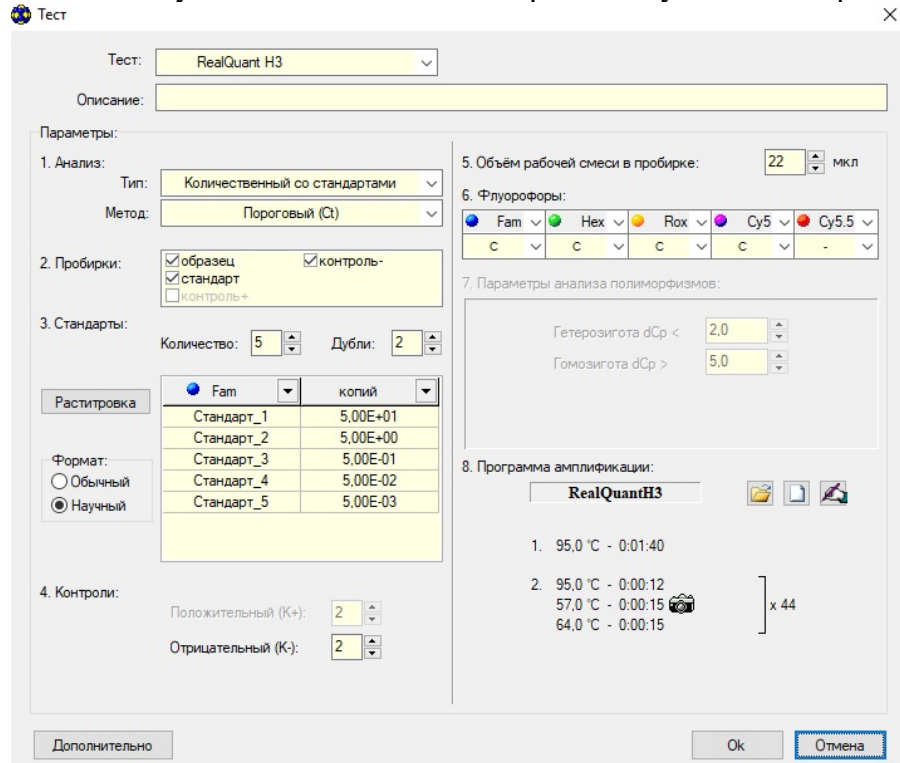
16. В открывшемся окне отметить «Предварительный нагрев» и нажать клавишу «Применить»



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



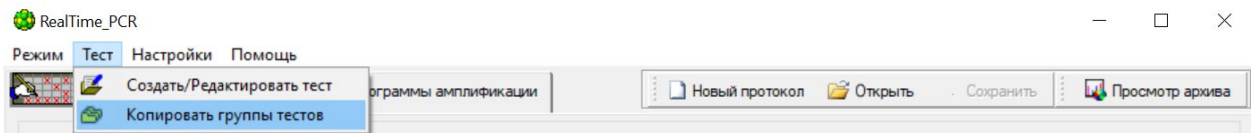
18. Кликнуть по клавише «Ok», в открывшемся окне выбрать директорию для сохранения программы амплификации и сохранить.
19. Затем нажать клавишу «Ok» в окне теста и выбрать папку для его сохранения.



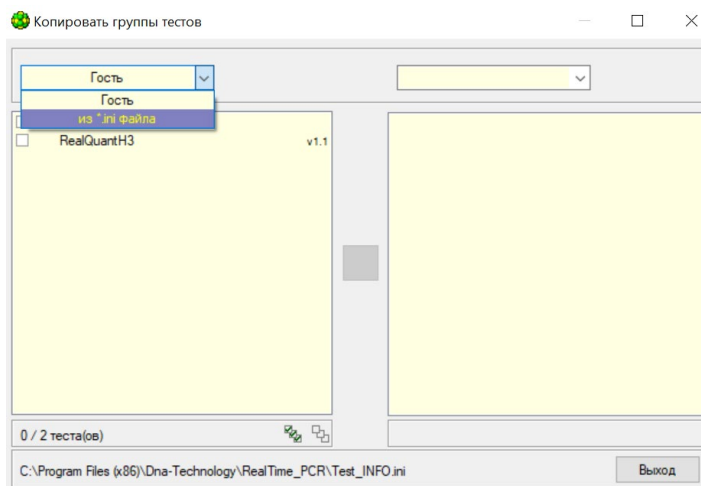
4.3.2. Установка шаблона

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

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



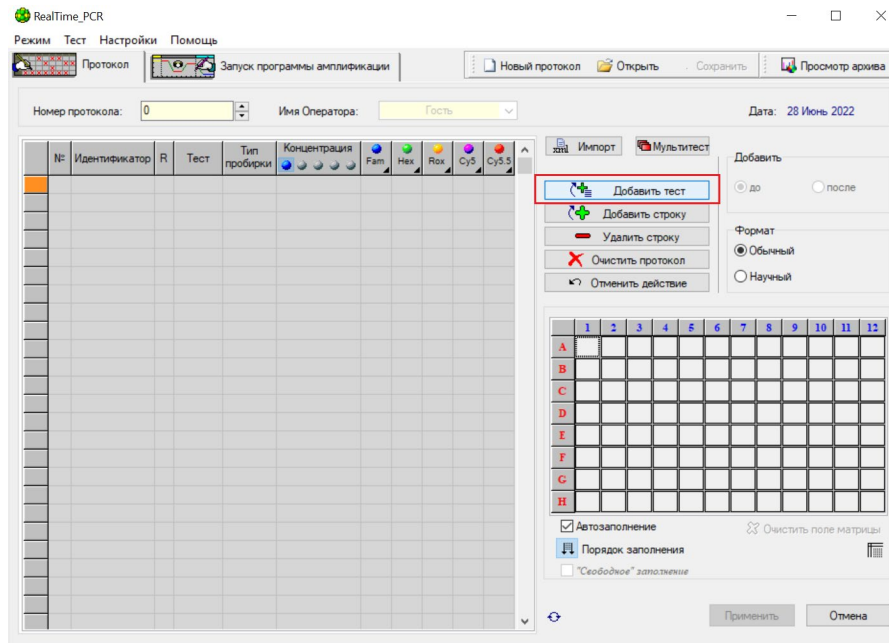
3. В открывшемся окне выбрать «из ini файла»



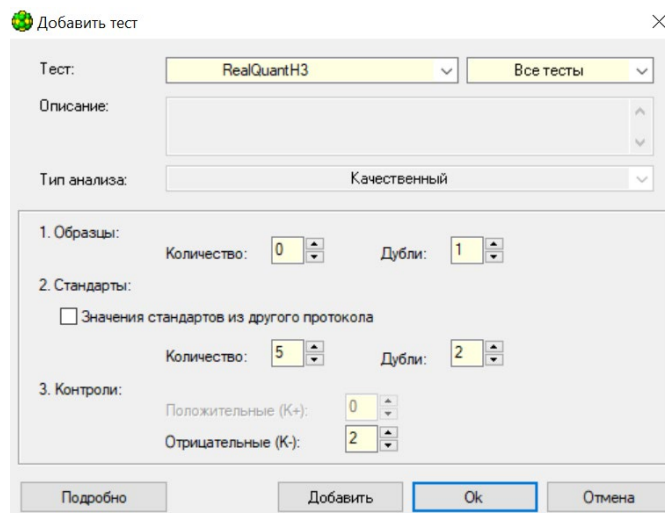
4. Во всплывшем окне выбрать файл с шаблоном и нажать «Открыть» для импорта в программное обеспечение **RealTime PCR**.

4.3.3. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3

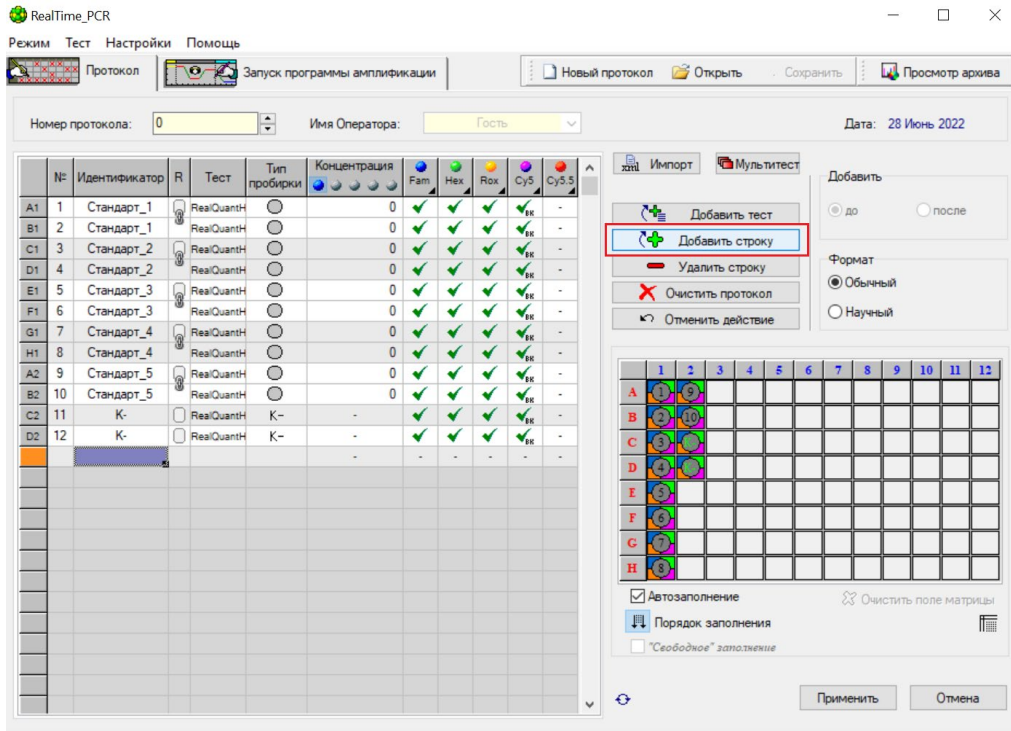
1. Открыть программу **RealTime PCR**
2. Кликнуть по клавише «Добавить тест».



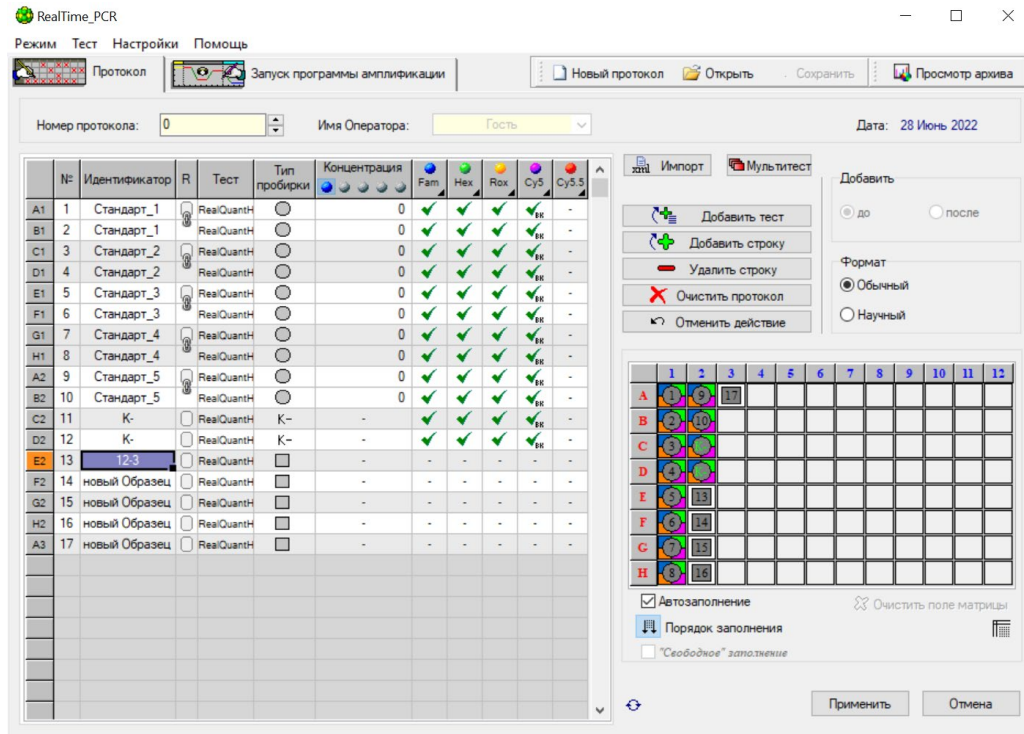
3. В открывшемся окне в строке «Тест» выбрать шаблон **RealQuant H3**, в пункте 1 «Образцы» установить 0 и нажать клавишу «Ок».



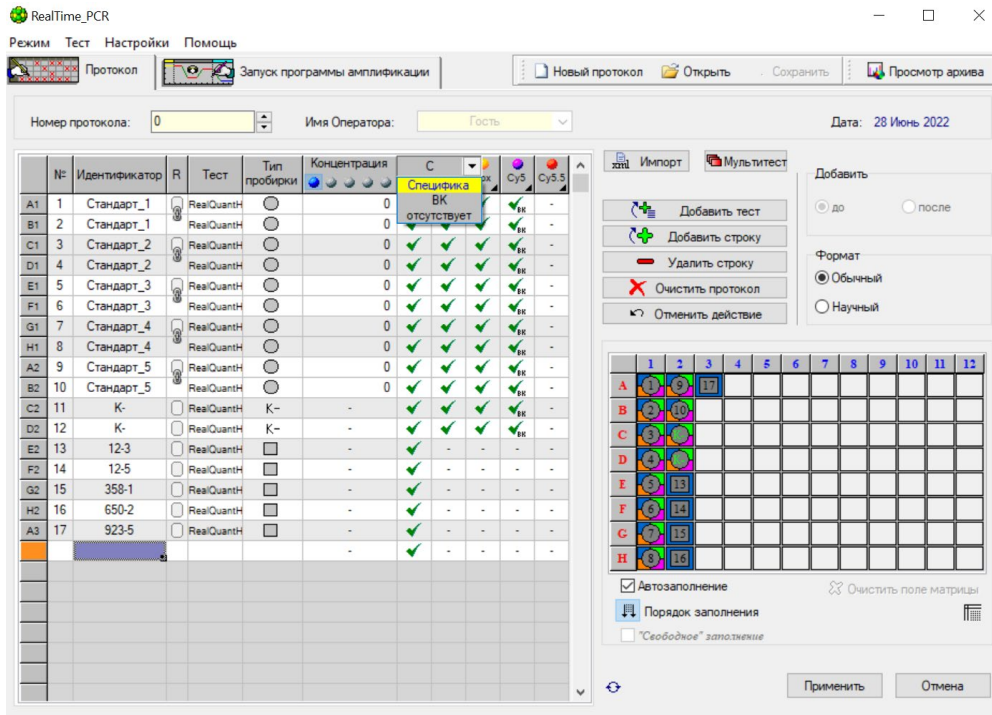
4. Выделить строку под «К-» и используя клавишу «Добавить строку» добавить необходимое кол-во исследуемых образцов.



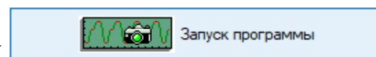
5. В поле «Идентификатор» указать названия образцов согласно их порядку в планшете.



6. Назначить мишени для исследуемого образца. FAM, HEX, ROX – специфика; Cy5-ВК. Нажать «Применить» в правом нижнем углу.



7. В открывшемся окне нажать клавишу



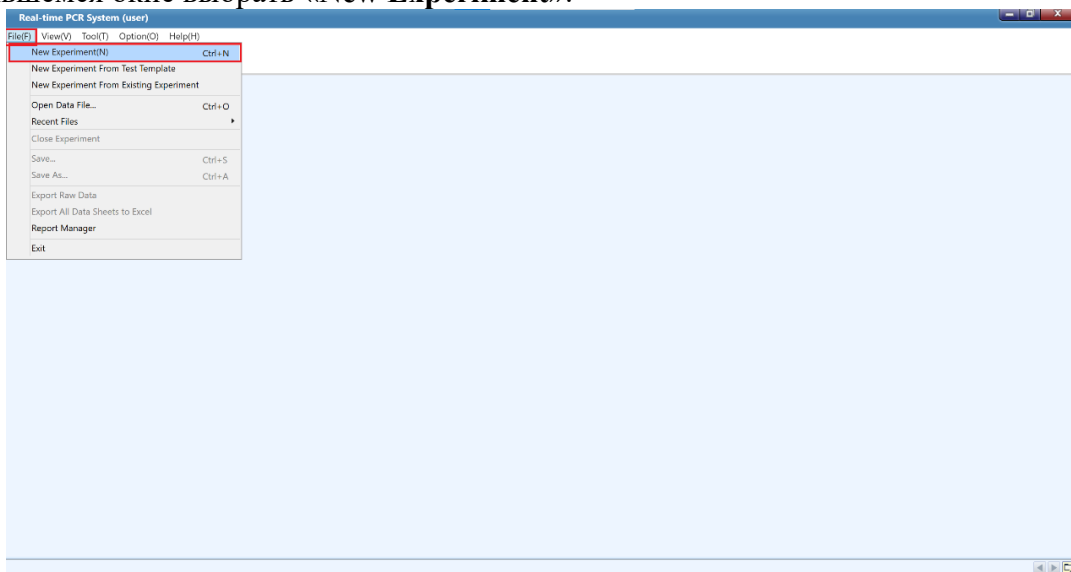
8. Выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «**Сохранить**».
- Прибор начнет работу.
9. Для анализа данных перейдите к пункту 5 данной инструкции.

4.4. Программное обеспечение и проведение ПЦР-РВ на приборе Gentier 96

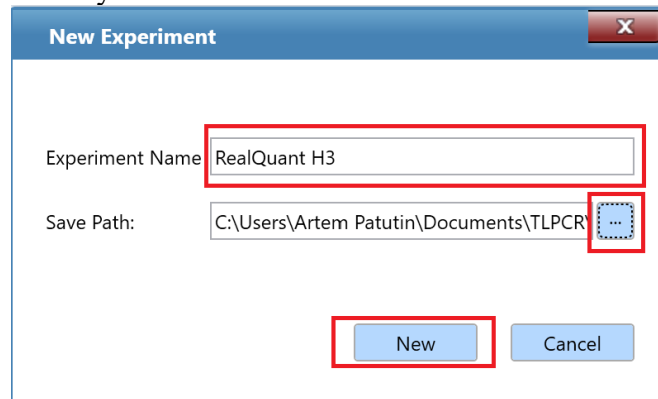
4.4.1. Создание шаблона эксперимента

Запустить программу **Real-time PCR System**.

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

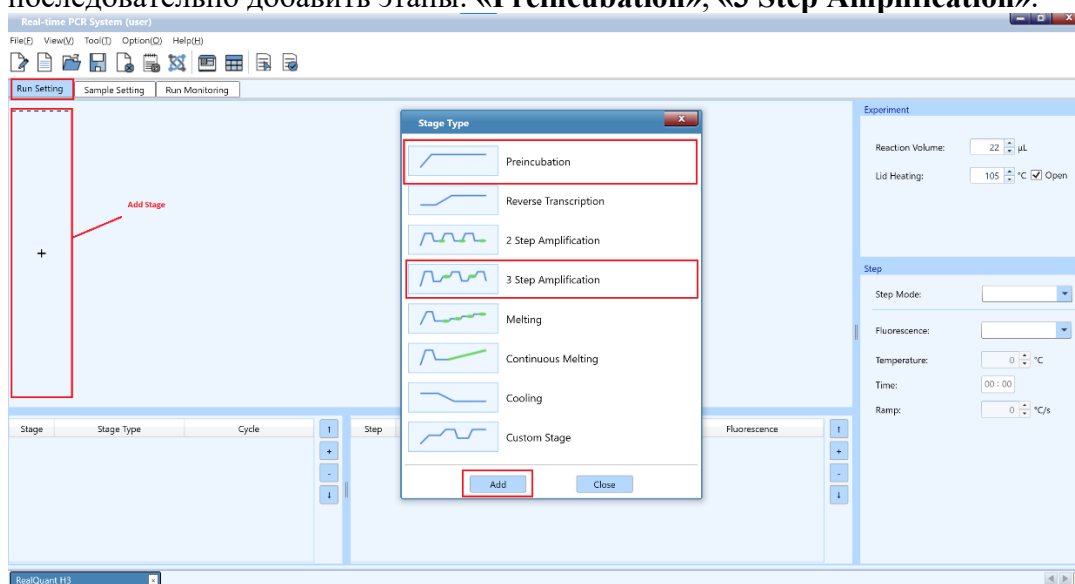


3. В открывшемся окне в поле «**Experiment Name**» ввести название шаблона «**RealQuant H3**». Указать путь до папки «**Templates**» в директории программы **Real-time PCR System**. Нажать кнопку «**New**»

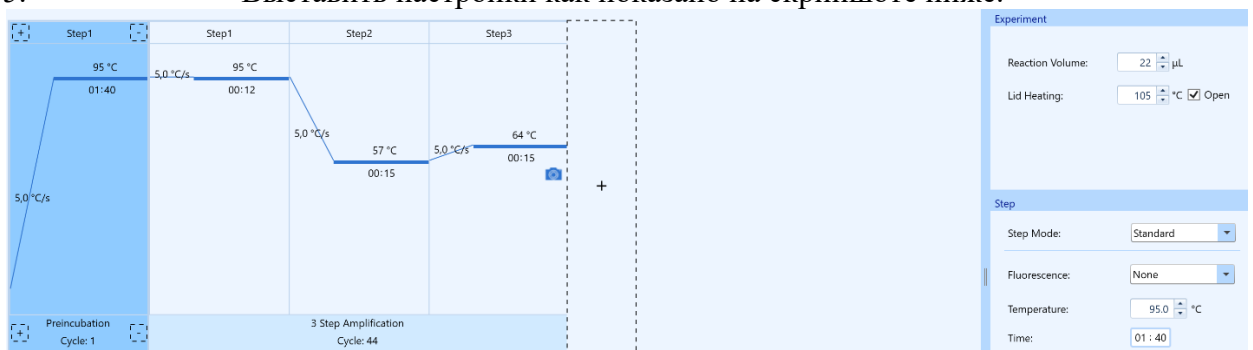


ВАЖНО! При отсутствии папки «**Templates**» ее необходимо создать. Для этого открыть папку **TLPCR** (раздел «**Документы (Documents)**»), и создать в ней папку «**Templates**»

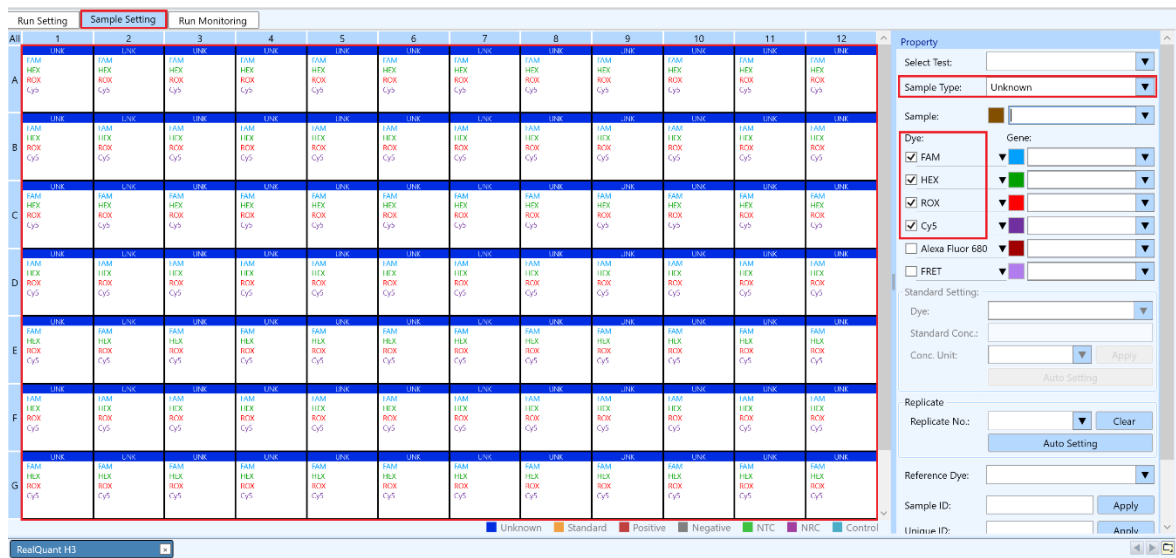
4. В разделе «**Run Setting**» нажать на кнопку «**Add Stage**», последовательно добавить этапы: «**Preincubation**», «**3 Step Amplification**».



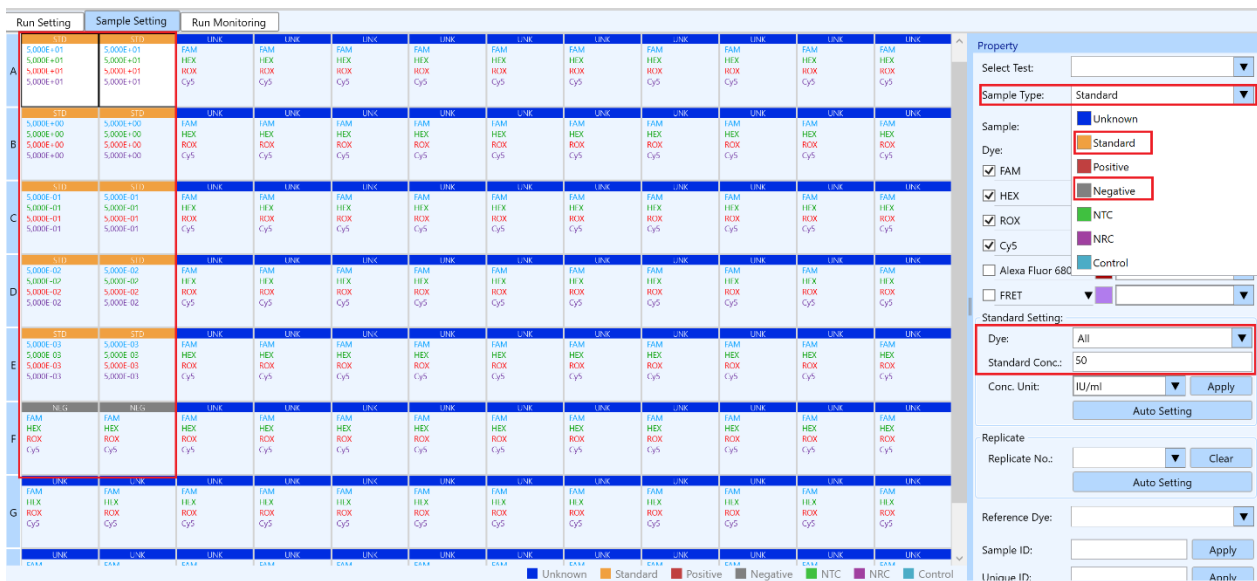
5. Выставить настройки как показано на скриншоте ниже.



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**.



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 КО1, в графе **Standard Conc.** 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**. Остальные образцы оставить **Unknown**.



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

File(F) View(V) Tool(T) Option(O) Help(H)

New Experiment(N) Ctrl+N
 New Experiment From Test Template
 New Experiment From Existing Experiment
 Open Data File... Ctrl+O
 Recent Files
 Close Experiment
 Save... Ctrl+S
Save As... Ctrl+A
 Export Raw Data
 Report Manager
 Exit

	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK
D	FAM HEX ROX Cy5	UNK	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
E	STD	STD	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK
F	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
G	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK

Property

Select Test:

Sample Type: Standard

Sample:

Dye: Gene:

FAM

HEX

ROX

Cy5

Alexa Fluor 680

FRET

Standard Setting:

Dye: All

Standard Conc.: 50

Conc. Unit: IU/ml

Replicate

Replicate No.:

Reference Dye:

Sample ID:

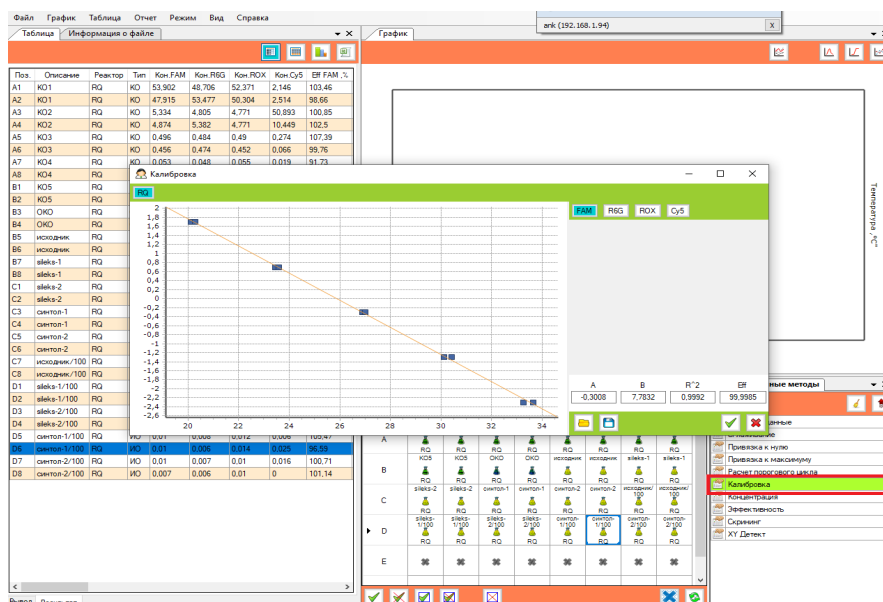
Unique ID:

Unknown Standard Positive Negative NTC NRC Control

5. АНАЛИЗ ДАННЫХ

5.1. Обработка результатов работы прибора АНК

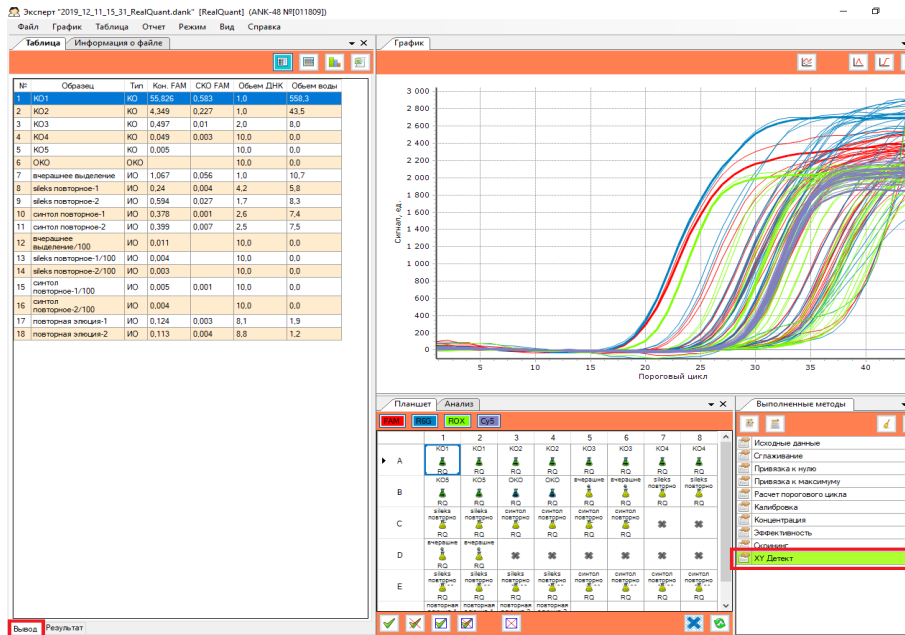
1. Открыть файл данных в программе ANK Shell. Для этого в программе «ANK Shell» нажать «**Просмотр файлов данных**» и открыть файл с результатами исследования, выбрав его в папке соответствующего прибора.
2. При использовании шаблонов «RQ» или «RQ-F» кликнуть по надписи "Калибровка" в правом нижнем углу.



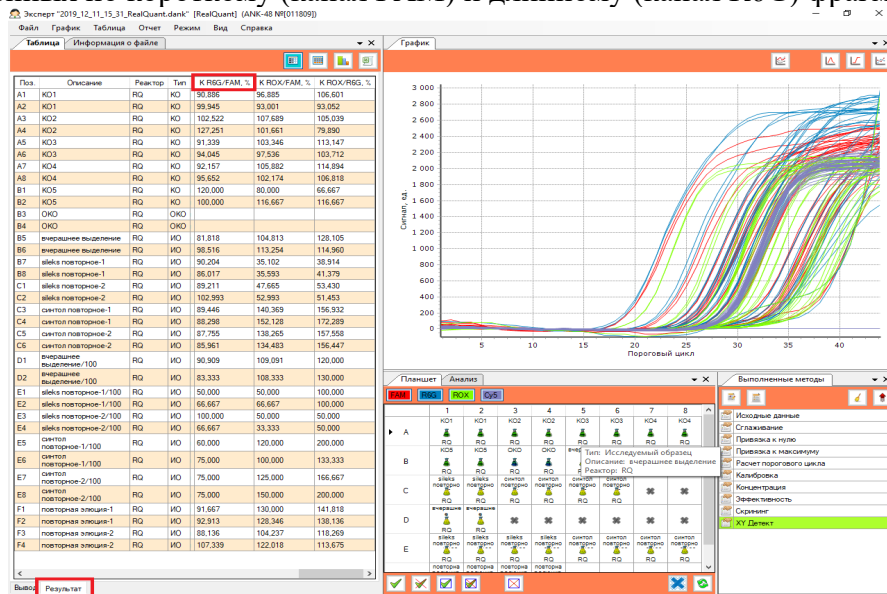
3. Убедиться, что параметры калибровочной прямой соответствуют требуемым значениям по каждому каналу ($R^2 > 0.99$; $E \geq 95\%$). Если параметры калибровочной прямой соответствуют критериям, перейти к п.4.

ВНИМАНИЕ!!! Если параметры калибровочной прямой не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с подготовленными КО. Если параметры калибровочной прямой 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!**

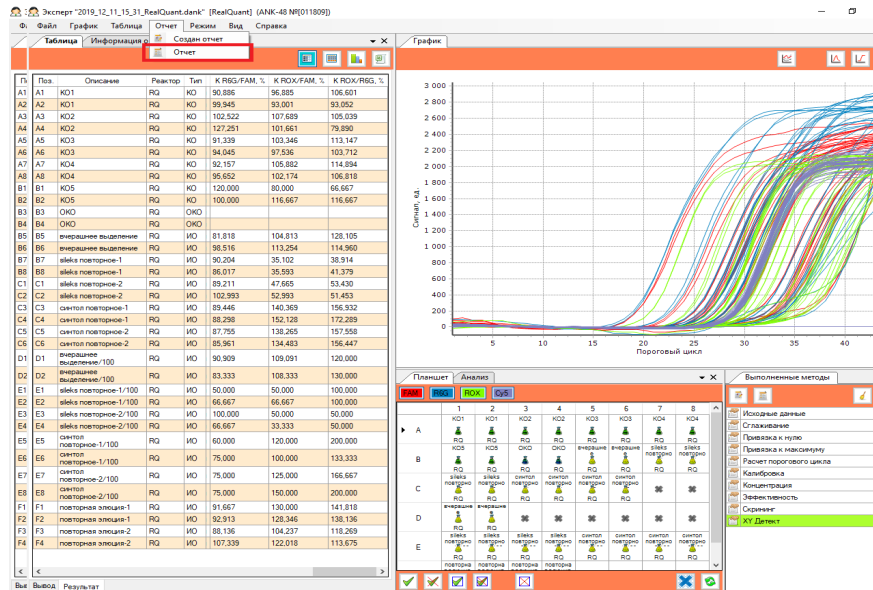
4. Перейти на вкладку "ХУ Детект" в раздел "Вывод" (слева внизу). Слева в таблице появятся значения концентраций ИО по каналу FAM (концентрация ДНК в исследуемых образцах определяется по короткому фрагменту).



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".



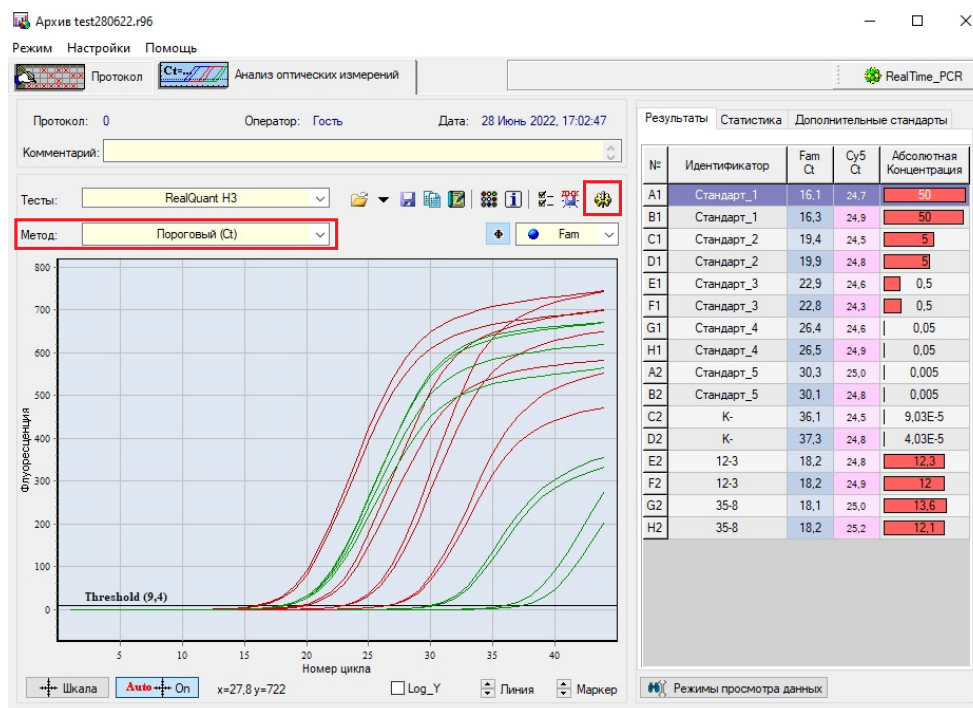
5.2. Обработка результатов работы прибора CFX96

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**→**Regression**.
7. Оценить **стандарты (St) KO1- KO5** и калибровочную прямую по каналам **FAM, HEX, ROX**. Убедиться, что параметры калибровочной прямой соответствуют допустимым значениям по каждому каналу ($R^2 > 0.99$; $E \geq 95\%$).
8. Включить **ВСЕ** 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.

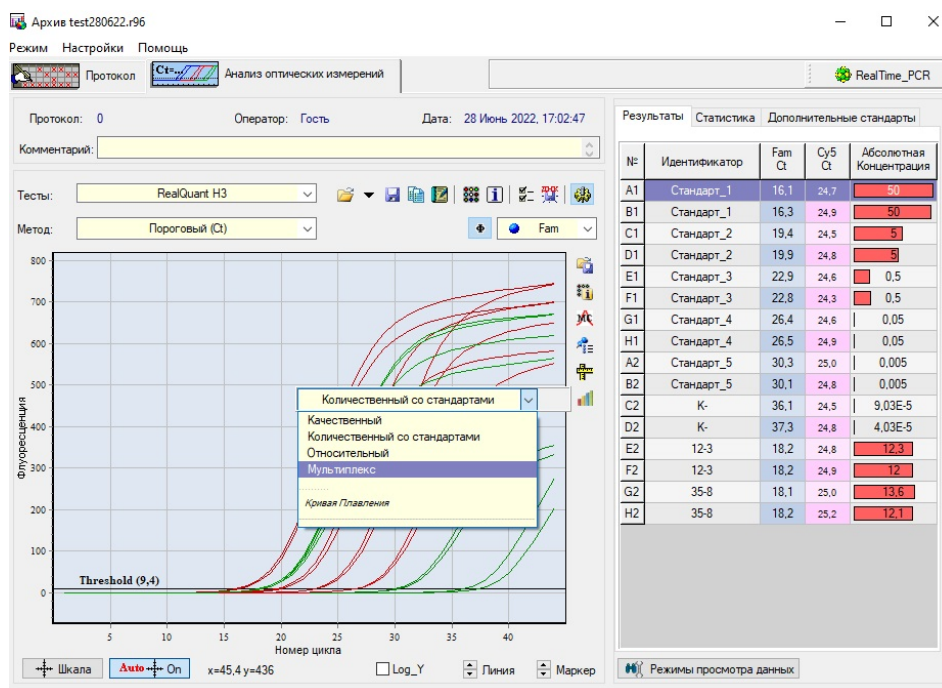
5.3. Обработка результатов работы прибора Dt-prime/Dt-lait

5.3.1. Анализ данных

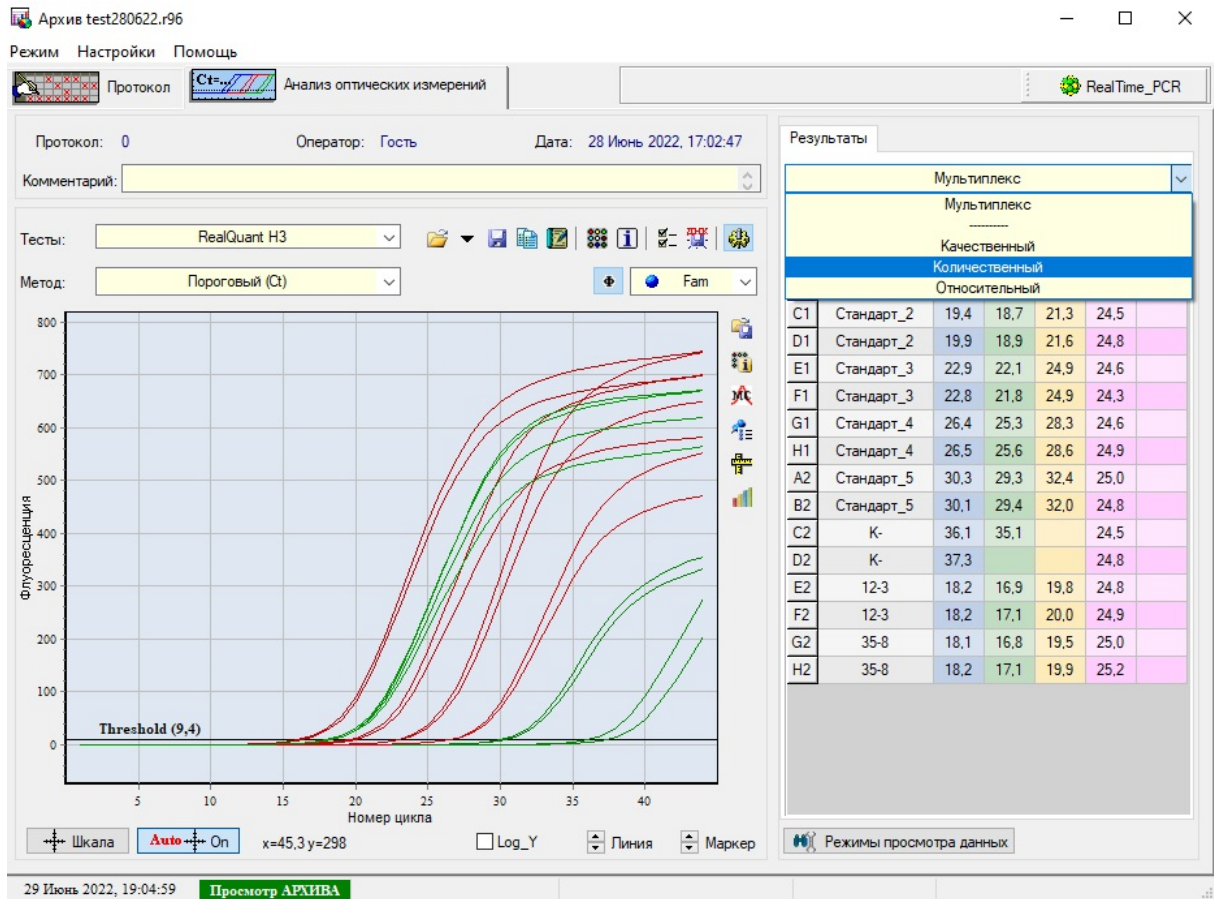
1. Открыть файл данных с помощью программы **RealTime PCR**
2. Убедиться, что в строке «Метод» отмеченно «**Пороговый Ct**» и кликнуть по иконке настроек.



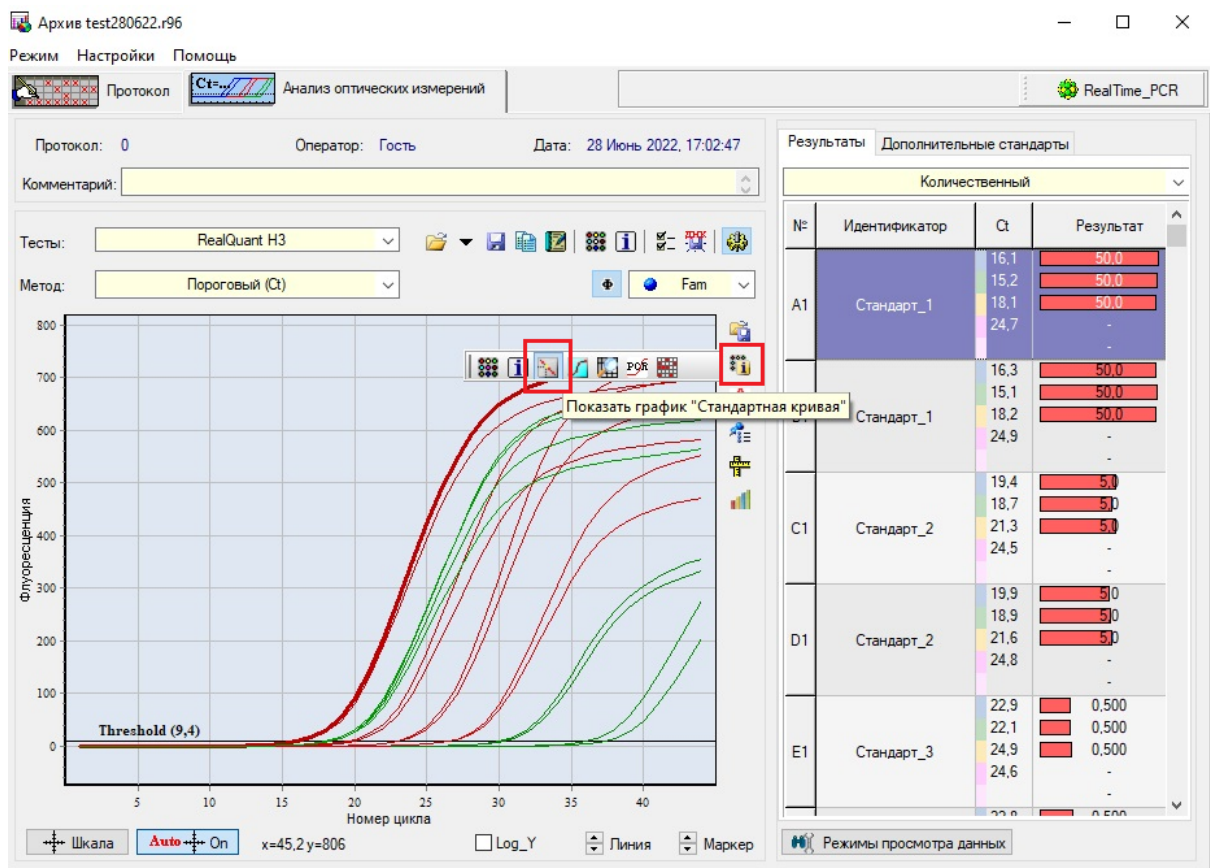
3. В появившемся списке выбрать последний пункт и указать метод «Мультиплекс».



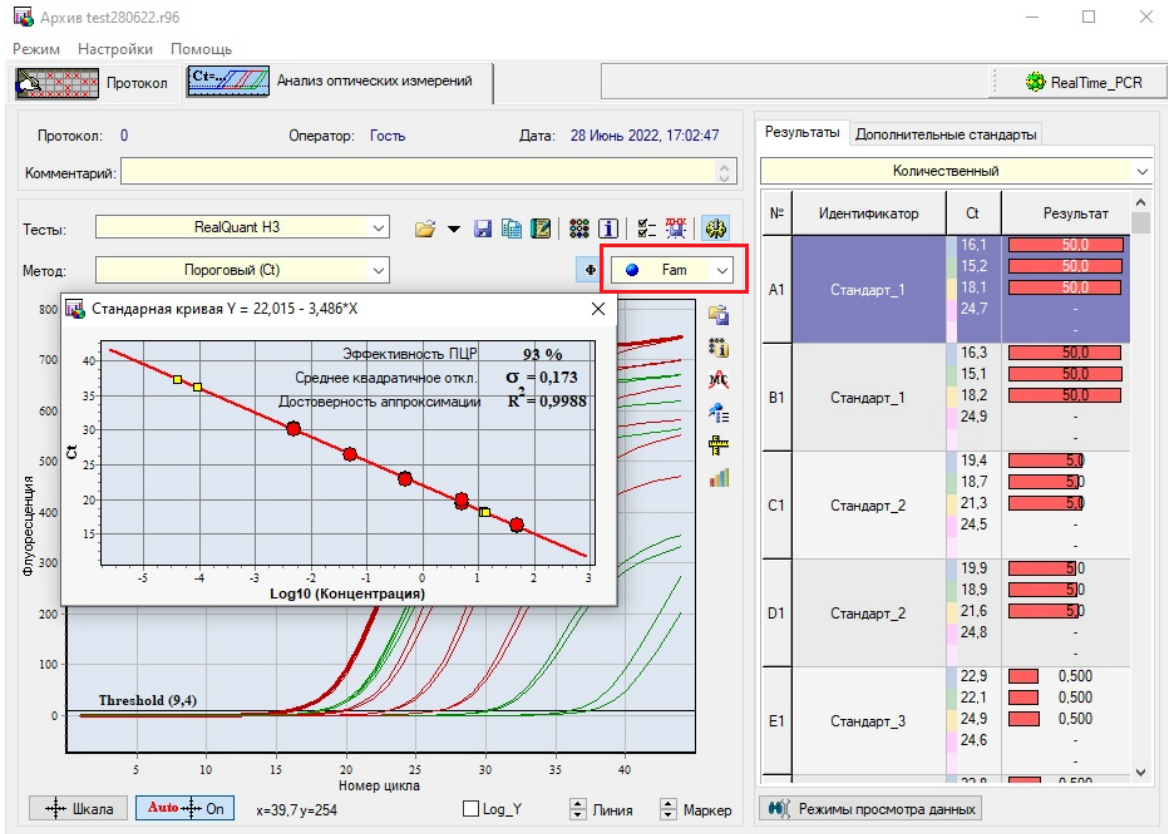
4. В правом верхнем углу выбрать «Количественный»



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

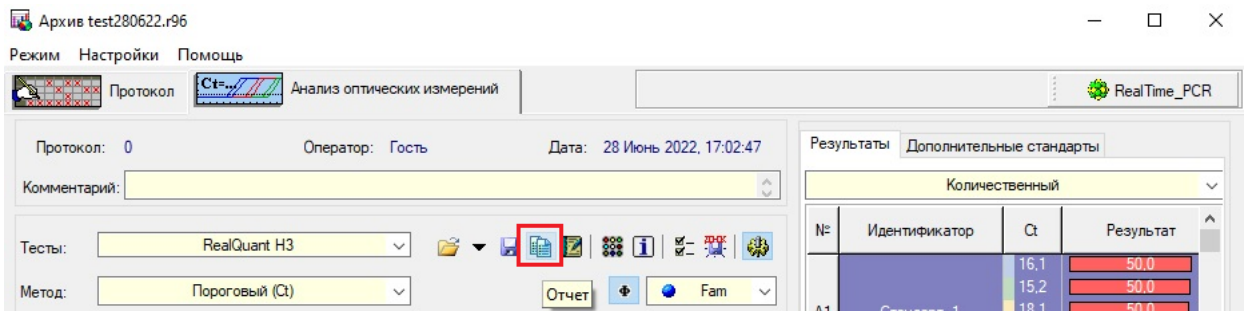


6. Убедиться, что параметры калибровочной прямой соответствуют требуемым значениям ($R^2 > 0.99$; $E \geq 90\%$) по каналам FAM, HEX, ROX.



ВНИМАНИЕ!!! Если параметры калибровочной прямой не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с подготовленными КО. Если параметры калибровочной прямой 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!**

7. Нажать на иконку «Отчет»

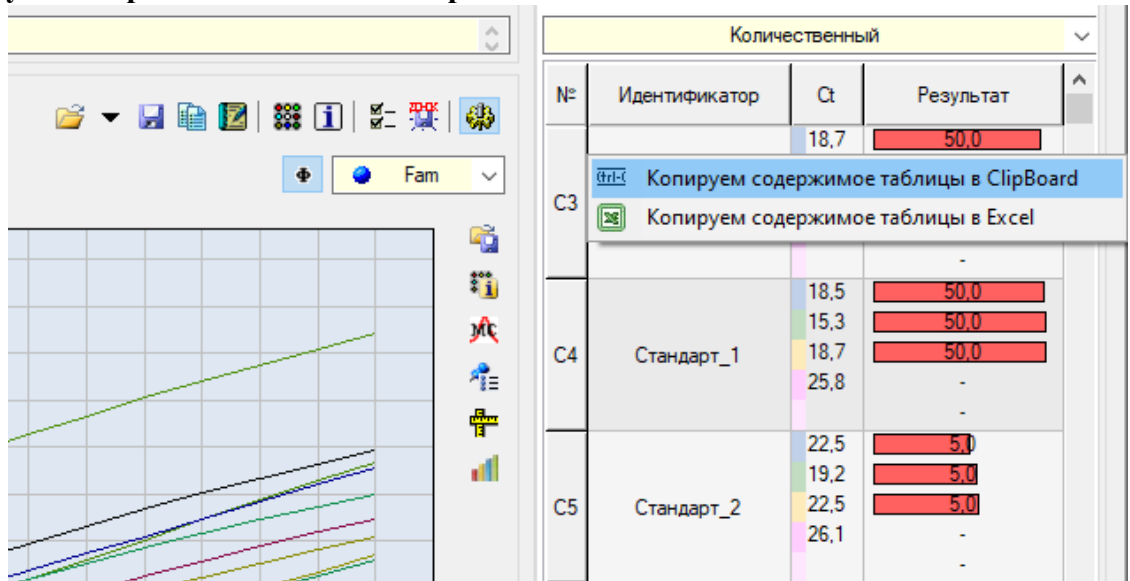


8. Проанализировать полученные результаты

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

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

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



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

	A	B	C	D	E	G	H	I	J	K
1	Название образца	Ct (FAM)	Ct (HEX)	Ct (ROX)	Ct (CYS)	Small Autosomal	Large Autosomal	Y		
2	Стандарт_1	18,70	15,40	18,90	26,20	50,00	50,00	50,00	-	-
3	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	K-	39,20			25,70	0,00	-	-	-	-
13	K-	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										
39										

- 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».

	A	B	C	D	G	I	J
1	Разведение препаратов ДНК до рабочей концентрации.						
2	Система «AmpF/STR® GlobalFiler™ PCR Amplification Kit».						
3							
4	Sample	С ДНК исх нг/мкл	С ДНК раб нг/мкл	Разведение общее	V исх ДНК мкл	Разведение I	Деградация
5	A	B	C	D = B/C	G	I	
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	

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.

Образец	Результат ПЦР-РВ по мишени				Интерпретация результата
	FAM	HEX	ROX	Cy5	
	aS	aL	Y	IPC	
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев					
St	Нет кривой амплификации по любой из мишеней			Есть/нет кривой амплификации	ПЦР-РВ прошла не корректно, проблемы с реагентами или амплификатором
NC	Нет кривой амплификации			Нет кривой амплификации	ПЦР-РВ прошла не корректно, проблемы с реагентами или амплификатором
NC	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла ($C_T \leq 35,0$)			Есть/нет кривой амплификации	Контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы					
Unknown	Нет кривой амплификации			Нет кривой амплификации	Ингибирование ПЦР-РВ
	Нет кривой амплификации/ Есть кривая амплификации после 35 цикла ($C_T > 35,0$)			Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	
	Есть кривая амплификации после 35 цикла ($C_T > 35,0$)		Есть кривая амплификации ранее 35 цикла ($C_T \leq 35,0$)	Есть/нет кривой амплификации	Ложноположительный результат
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих данных					
St	Есть кривая амплификации			Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC ($C_T \leq C_{T NC} + 2$)	Набор реагентов специфичен в отношении ДНК человека. Подтверждение работоспособности смеси, результаты подлежат учету.
NC	Нет кривой амплификации/Есть кривая амплификации после 35 цикла ($C_T > 35,0$)			Есть кривая амплификации в диапазоне 25-29 цикла $C_T = 25-29$	Контаминация отсутствует
Unknown	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла ($C_T \leq 35,0$)			Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC ($C_T \leq C_{T NC} + 2$)	В пробе содержится ДНК человека, ингибирование отсутствует.
	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла ($C_T \leq 35,0$)		Нет кривой амплификации/Есть кривая амплификации после 35 цикла ($C_T > 35,0$)	Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC ($C_T \leq C_{T NC} + 2$)	В пробе содержится ДНК человека женского пола
	Деградированные образцы				
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла ($C_T \leq 35,0$)		Нет кривой амплификации/Есть кривая амплификации,	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла ($C_T \leq 35,0$)	Кривая амплификации	В пробе содержится деградированная ДНК человека мужского пола

Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ct ≤ 35,0)	которая отстает от кривой амплификации мишени Small Autosomal более чем на 1 цикл	Нет кривой амплификации/Есть кривая амплификации после 35 цикла (Ct > 35,0)	равна или опережает кривую амплификации NC (Ct ≤ Ct _{NC} +2)	В пробе содержится деградированная ДНК человека женского пола
Образцы с ингибиторами ПЦР				
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ct ≤ 35,0)			Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	В пробе содержится ДНК человека, мужского пола, ингибирование ПЦР-РВ
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ct ≤ 35,0)		Нет кривой амплификации/Есть кривая амплификации после 35 цикла (Ct > 35,0)	Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	В пробе содержится ДНК человека женского пола, ингибирование ПЦР-РВ
Нет ДНК человека				
Нет кривой амплификации/Есть кривая амплификации после 35 цикла (Ct > 35,0)			Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (Ct ≤ Ct _{NC} +2)	В пробе отсутствует ДНК человека.

6.1. Оценка результатов анализа

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

Расчет степени деградации ДНК в образце осуществляется по формуле:

$$\frac{\text{Концентрация мишени aS (нг/мкл)}}{\text{Концентрация мишени aL (нг/мкл)}}$$

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:

$$\text{Мужская ДНК:женская ДНК} = \frac{Y \text{ (нг/мкл)}}{Y \text{ (нг/мкл)}} : \frac{(aS \text{ (нг/мкл)} - Y \text{ (нг/мкл)})}{Y \text{ (нг/мкл)}}$$

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 ≤ Ct_{NC}+2. Получение значений, превышающих значение Ct для IPC отрицательного контроля (NC)

более чем на 2 цикла ($Ct > Ct_{ок0} + 2$) 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 $Ct > Ct_{ок0} + 2$, 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, syntol@syntol.ru