

Модель: **RealQuant H3 AB-100**  HG-403AB-100

RealQuant H3 AB-200  HG-403AB-200

RealQuant H3 AB-400  HG-403AB-400

**Набор реагентов для обнаружения и определения концентрации
ДНК человека, степени ее деградации и половой принадлежности
методом ПЦР в реальном времени «RealQuant H3»**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



СОДЕРЖАНИЕ

1.	НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
1.1.	Назначение набора.....	4
1.2.	Описание моделей набора.....	4
1.3.	Область применения.....	4
1.4.	Потенциальные пользователи.....	4
1.5.	Принцип метода, положенный в основу работы набора.....	4
2.	ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	6
2.1.	Состав набора.....	6
2.2.	Функциональные характеристики.....	6
3.	УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА.....	7
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	7
5.	ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА.....	8
6.	ПОДГОТОВКА К АМПЛИФИКАЦИИ.....	9
6.1.	Подготовка калибровочных образцов.....	9
6.2.	Подготовка к проведению ПЦР-РВ.....	9
7.	ПРОГРАММИРОВАНИЕ ПРИБОРА И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-РВ.....	11
7.1.	Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе 7500 Real-Time PCR System.....	11
7.1.1.	Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio».....	11
7.1.2.	Программное обеспечение HID в режиме «Custom Assays».....	13
7.1.2.1.	Создание шаблона эксперимента.....	13
7.1.2.2.	Установка готового шаблона для режима «Custom Assays».....	21
7.1.2.3.	Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона «RealQuant H3 AB».....	21
7.1.3.	Заполнение названия образцов в шаблоне Excel.....	26
7.2.	Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе QuantStudio 5.....	30
8.	АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	38
8.1.	Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio».....	38
8.1.1.	Обработка результатов.....	38
8.1.2.	Виртуальная калибровочная кривая.....	39
8.1.2.1.	Создание виртуальной калибровочной кривой.....	40
8.1.2.2.	Применение виртуальной калибровочной кривой.....	41
8.2.	Программное обеспечение HID в режиме «Custom Assay».....	42
8.2.1.	Обработка результатов.....	42
8.2.2.	Автоматический расчет степени деградации и разведения.....	45
8.3.	Программное обеспечение QuantStudio™ Design& Analysis Software.....	46
8.4.1.	Обработка результатов.....	46
8.4.2.	Автоматический расчет степени деградации и разведения.....	49

9.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	51
9.1.	Интерпретация результатов	51
9.2.	Оценка результатов анализа.....	52
10.	ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	54
11.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	54
12.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	54

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Назначение набора

Набор реагентов «RealQuant H3» предназначен для обнаружения ДНК человека и определения ее количества, степени ее деградации и половой принадлежности методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

1.2. Описание моделей набора

Модели набора «RealQuant H3 AB-100» (кат. № HG-403AB-100), «RealQuant H3 AB-200» (кат. № HG-403AB-200), «RealQuant H3 AB-400» (кат. № HG-403AB-400) предназначены для проведения ПЦР-РВ с использованием следующих приборов: 7500 Real-Time PCR System, QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Модели включают пробирку с реакционным буфером и пробирку со смесью специфических праймеров и зондов для приготовления готовой реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ. Модели рассчитаны на проведение соответственно 100, 200 и 400 реакций, включая контрольные образцы.

1.3. Область применения

Набор может быть использован в молекулярно-генетических лабораториях, занимающихся анализом геномной ДНК (в том числе в лабораториях, проводящих судебно-медицинскую экспертизу, и лабораториях экспертно-криминалистических центров), а также в научно-исследовательских лабораториях и учреждениях.

Результаты, полученные с использованием набора «RealQuant H3», 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.

1.4. Потенциальные пользователи

К работе с набором допускаются специалисты с высшим или средним медицинским, биологическим или ветеринарным образованием, получившие дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

1.5. Принцип метода, положенный в основу работы набора

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

Для повышения чувствительности детекции в наборе «RealQuant H3» 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 1 приведены мишени, их описание и используемые красители.

Таблица 1 – Выявляемые мишени

№	Мишень	Описание мишени	Краситель
1	Y	ДНК Y-хромосомы	FAM
2	aS	короткий фрагмент аутосомной ДНК	VIC
3	aL	длинный фрагмент аутосомной ДНК	TAMRA

№	Мишень	Описание мишени	Краситель
4	IPC	внутренний положительный контроль	ROX
Пассивный референсный краситель			MP

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 кривой, 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.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав набора

Таблица 2 – Состав моделей «RealQuant H3 AB-100», «RealQuant H3 AB-200», «RealQuant H3 AB-400»

№	Компонент	Описание	Номиналь ный объем, мл	Количество		
				RealQuant H3 AB-100	RealQuant H3 AB-200	RealQuant H3 AB-400
1.	РБ-RQ	Реакционный буфер для ПЦР	1,0	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки
2.	СПЗ-RQAB	Смесь специфических праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для ПЦР	1,0	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки
3.	ПКО RQ	Положительный контрольный образец, содержащий синтетические фрагменты различной длины аутосомной ДНК и Y-хромосомы человека в концентрации 50 нг/мкл	0,03	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки
4.	ДНК-буфер	Буфер для разведения ПКО RQ	1,2	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки
5.	ОКО	Отрицательный контрольный образец	0,2	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки

2.2. Функциональные характеристики

Аналитическая чувствительность набора составляет 0,005 нг/мкл ДНК человека.

Диапазон достоверной оценки концентрации ДНК человека 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 млекопитающих, птиц и рыб (см. таблицу 3). Таким образом, набор позволяет достоверно определить наличие или отсутствие ДНК человека, ее концентрацию, степень деградации и половую принадлежность даже в образцах, содержащих ДНК млекопитающих, птиц и рыб.

Таблица 3 – Млекопитающие, птицы и рыбы, с ДНК которых проводились испытания по определению специфичности набора «RealQuant H3»

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

3. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА

Хранение: в защищенном от света месте, при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.

Транспортирование: крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным, воздушным) при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Допускается транспортирование при температуре до 8 °С в течение 7 дней.

Эксплуатация: Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 15 °С до 35 °С и относительной влажности воздуха от 15 % до 75 %. Набор должен применяться в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Набор предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. п. 1.2). Набор реагентов готов к применению согласно инструкции.

Срок годности набора: 14 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения. Срок годности реагентов до и после вскрытия соответствует сроку годности набора.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работа с набором должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований МУ 1.3.2569-09, СанПиН 3.3686-21, СанПиН 2.1.3684-21.

К работе с набором допускается только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению исследования материала методом ПЦР-РВ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор реагентов строго по назначению;
- Соблюдать правила последовательной обработки материала и поточность продвижения исследуемого материала. Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое;
- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром;
- Не допускать открытие пробирок с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации;
- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию в паспорте качества;
- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами;
- Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека: канцерогенный эффект, мутагенное действие, репродуктивная токсичность отсутствуют.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности изделие является

безопасным.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- ПЦР-бокс;
- прибор для проведения ПЦР-РВ, имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, VIC, TAMRA, ROX, MP (либо их спектральным аналогам): 7500 Real-Time PCR System, QuantStudio 5 (Applied Biosystems);
- центрифуга для микропробирок объемом 0,2 мл;
- микроцентрифуга-вортекс;
- штатив для ПЦР-плашек или стрипов объемом 0,2 мл (например, «ПЦР-96», кат. № СТ-12);
- штатив для пробирок объемом 1,5/2,0 мл (например, «РМ-96х1,5/2,0», кат. № СТ-17);
- набор дозаторов пипеточных переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл;
- холодильник от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой не выше минус 16 °С;
- наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл, не содержащие ДНКаз;
- ПЦР-планшеты или микропробирки для ПЦР-РВ в стрипах, не содержащие ДНКаз, объемом 0,2 мл, совместимые с указанными приборами для проведения ПЦР-РВ;
- пленка для ПЦР-планшетов или крышки к микропробиркам в стрипах;
- микроцентрифужные пробирки, не содержащие ДНКазы, объемом 1,5 и 2,0 мл (для приготовления калибровочных образцов и реакционной смеси);
- емкость для сброса использованных материалов.

6. ПОДГОТОВКА К АМПЛИФИКАЦИИ

6.1. Подготовка калибровочных образцов

Для количественной оценки концентрации ДНК с помощью набора «RealQuant H3» требуется калибровочная кривая, получаемая с помощью постановки в ПЦР-ПВ калибровочных образцов. Для приготовления калибровочных образцов используется ПКО RQ, входящий в состав набора и содержащий синтетические фрагменты ДНК человека в концентрации 50 нг/мкл.

1. Разморозить пробирки с ПКО RQ и ДНК-буфером. Перемешать на вортексе и центрифугировать для сброса капель.

Примечание – ПКО RQ в исходной концентрации будет использован в качестве первого калибровочного образца (St1).

2. Отобрать и маркировать (St2, St3, St4, St5) 4 микроцентрифужных пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.
3. Внести в промаркированные пробирки по 90 мкл ДНК-буфера.
4. Приготовить калибровочные образцы St2, St3, St4, St5 путем разведения ПКО RQ (St1) согласно протоколу, указанному в таблице 4.

Таблица 4 – Приготовление калибровочных образцов St2, St3, St4, St5

Стандарт	Концентрация, нг/мкл	Приготовление	Разведение
St1	50	ПКО RQ в исходной концентрации	-
St2	5	90 мкл ДНК-буфера + 10 мкл St1	10х
St3	0,5	90 мкл ДНК-буфера + 10 мкл St2	10х
St4	0,05	90 мкл ДНК-буфера + 10 мкл St3	10х
St5	0,005	90 мкл ДНК-буфера + 10 мкл St4	10х

ВАЖНО! Для добавления каждого образца St в пробирку с ДНК-буфером необходимо использовать новый наконечник с аэрозольным барьером.

ВАЖНО! После добавления образца St в пробирку с ДНК-буфером раствор необходимо пипетировать не менее 10 раз, затем перемешать на вортексе. После перемешивания пробирку с раствором временно центрифугировать для сброса капель.

Примечание – Приготовленные калибровочные образцы ДНК могут храниться при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 10 суток для повторного использования.

6.2. Подготовка к проведению ПЦР-ПВ

1. Для приготовления рабочей реакционной смеси (РС) рассчитать требуемые количества реагентов РБ-RQ и СПЗ-RQAB согласно таблице 5.

Таблица 5 – Расход реагентов при приготовлении реакционной смеси (РС)

Реагент	Расход реагента	
	на 1 реакцию, мкл	рекомендуемое количество для N образцов
РБ-RQ	10	10 x (N+12)
СПЗ-RQAB	10	10 x (N+12)
Обозначения: N – количество исследуемых образцов; 12 – контрольные образцы (St, NC) в двух повторях.		

Примечание - Рекомендуемая формула расчета предполагает проведение реакции для каждого контрольного образца в двух повторах.

- Разморозить пробирки с *РБ-RQ* и *СПЗ-RQAB*, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.

Примечание - После размораживания допускается хранение *РБ-RQ* и *СПЗ-RQAB* при температуре от 2 °С до 8 °С в течение месяца. Допускается повторное замораживание реагентов (до 10 циклов замораживания-оттаивания).

- Смешать необходимый объем *РБ-RQ* и *СПЗ-RQAB* в чистой пробирке объемом 1,5 или 2 мл (в зависимости от конечного объема приготовления), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать.
- Внести в микропробирки для ПЦР (планшеты, стрипы объемом 0,2 мл) по 20 мкл приготовленной РС.
- Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в микропробирки (на стенку) по 2 мкл исследуемых образцов (ИО), отрицательный контрольный образец (NC, использовать реагент *ОКО*), калибровочные образцы St5, St4, St3, St2, St1. Закрыть пробирки.
- Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать 30 с при 3000 об/мин. Убедиться в отсутствии пузырей в микропробирках.

Примечание – В случае наличия пузырьков аккуратно постучать пальцем по микропробиркам для поднятия пузырьков из толщи РС наверх. Снова центрифугировать микропробирки 30 с при 3000 об/мин.

- Поместить пробирки в прибор для ПЦР-РВ в соответствии с рисунком 1, где St – калибровочный образец, NC – отрицательный контрольный образец, U – исследуемый образец.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St1	St1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
B	St2	St2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
C	St3	St3	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D	St4	St4	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
E	St5	St5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
F	NC	NC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
G	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Рисунок 1 – Рекомендуемый порядок размещения образцов в приборах

7500 Real-Time PCR System, QuantStudio 5

- Запустить программу амплификации (см. п. 7 «Программирование прибора и проведение ПЦР-РВ»).

7. ПРОГРАММИРОВАНИЕ ПРИБОРА И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-РВ

7.1. Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе 7500 Real-Time PCR System

7.1.1. Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio»

ВАЖНО! Использовать стандартный режим программного обеспечения HID возможно только в случае калибровки амплификатора с помощью «Набора для спектральной калибровки амплификатора 7500 Real-Time PCR System» (ООО «НПФ Синтол», кат. № HG-701).

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Открыть программу **HID**, кликнуть по иконке «**Quantifiler® Trio**» (рисунок 2).

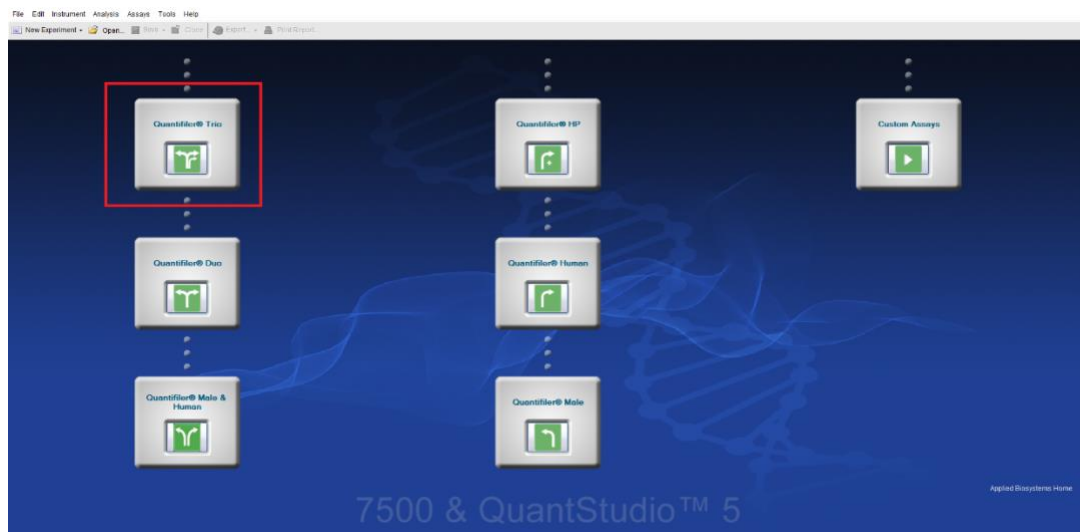


Рисунок 2

3. В открывшемся окне в графе «**Experiment Name**» задать имя эксперимента (рисунок 3).

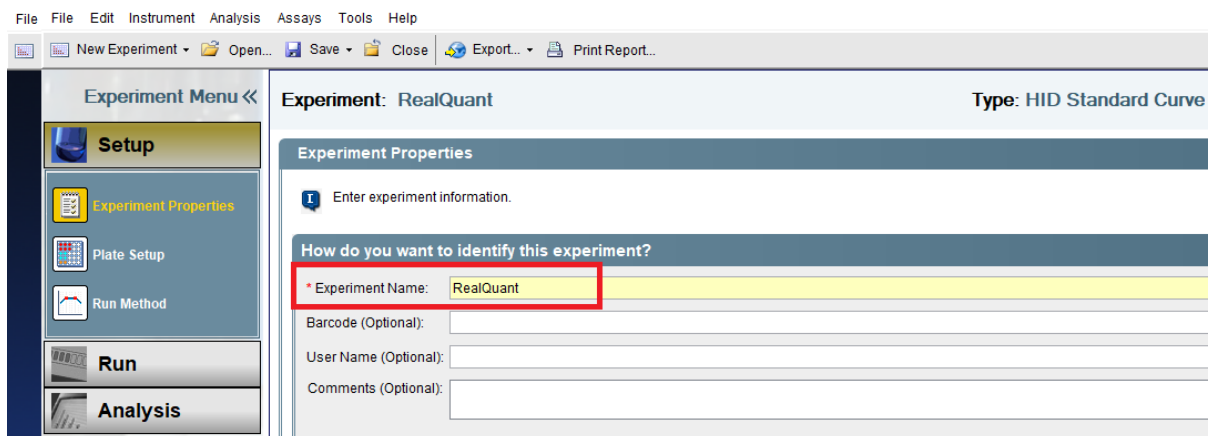


Рисунок 3

4. Перейти на вкладку «**Plate Setup**» (рисунок 4).



Рисунок 4

5. Добавить необходимое количество образцов с помощью кнопки «Add New Sample» и назвать их (рисунок 5). Перейти на вкладку «Assign Targets and Samples».

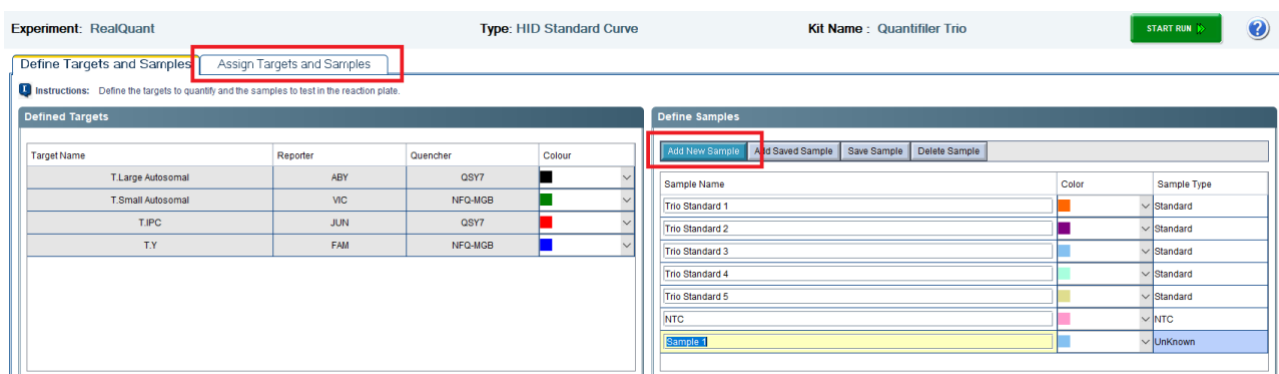


Рисунок 5

6. Расположить стандартные образцы (**Trio Standard**) согласно их положению в планшете, присвоить названия исследуемых образцов соответствующим лункам планшета (рисунок 6).

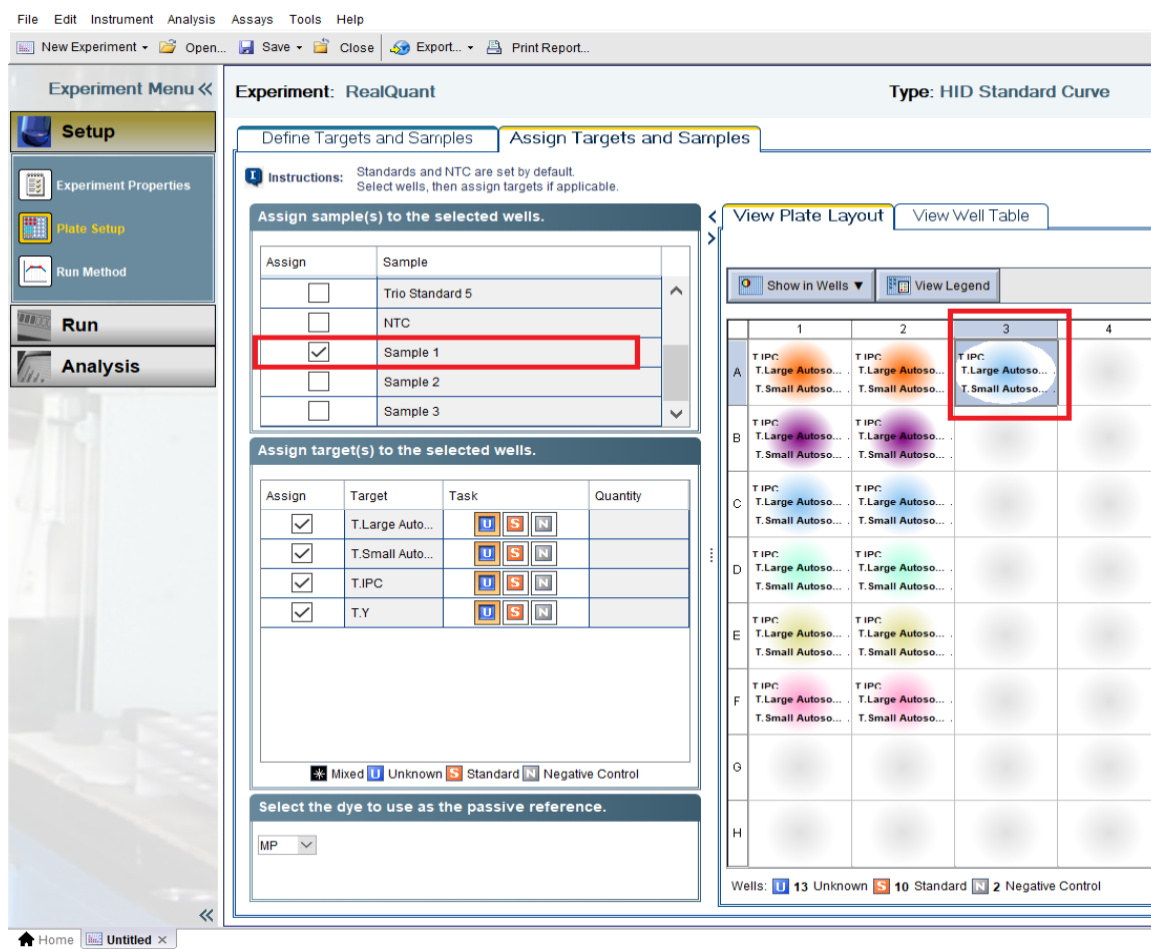


Рисунок 6

7. В правом верхнем углу нажать кнопку «**Start Run**» (рисунок 7).

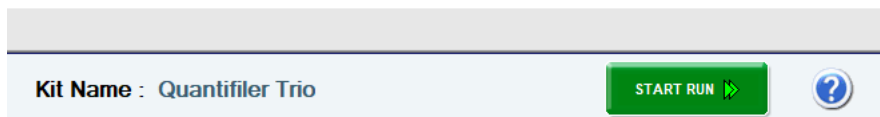


Рисунок 7

8. В открывшемся окне выбрать папку для сохранения данных и нажать «**Save**».

7.1.2. Программное обеспечение HID в режиме «Custom Assays»

7.1.2.1. Создание шаблона эксперимента

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Открыть программу **HID**, кликнуть по иконке «**Custom Assays**» (рисунок 8).



Рисунок 8

- Далее кликнуть по иконке «Advanced Setup» (рисунок 9).



Рисунок 9

- В открывшемся окне установить параметры, указанные на рисунке 10.

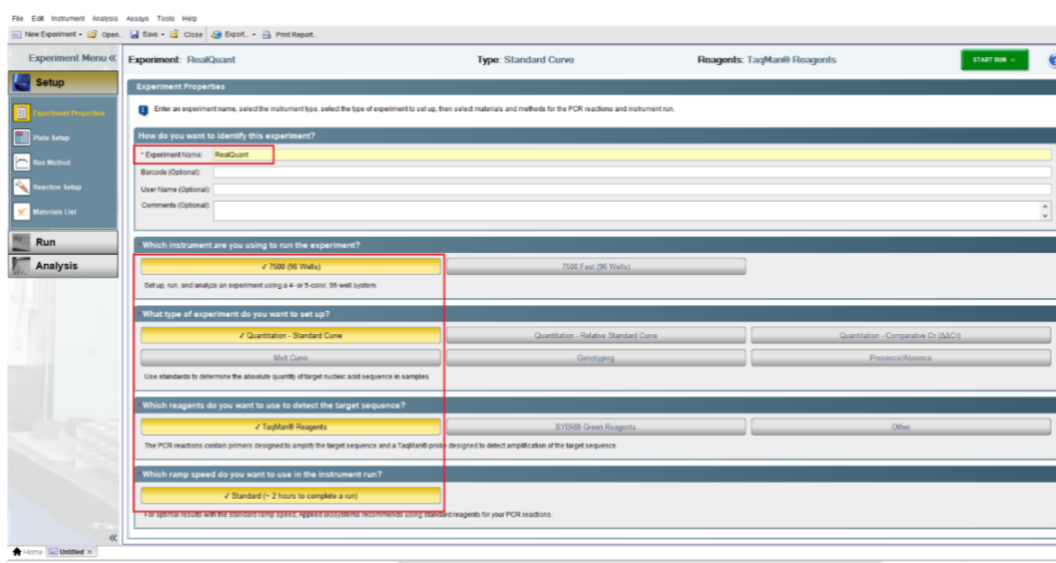


Рисунок 10

- Перейти на вкладку «Plate Setup» в левой верхней части монитора (рисунок 11).

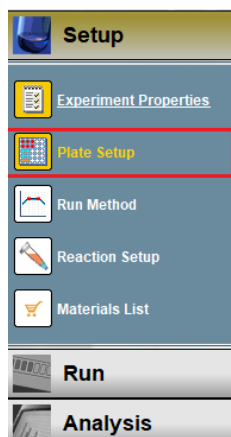


Рисунок 11

6. В открывшемся окне во вкладке «**Define Targets and Samples**» в разделе «**Define Targets**» к существующей мишени (Target1) добавить еще три мишени, кликая по «**Add New Target**» (рисунок 12).

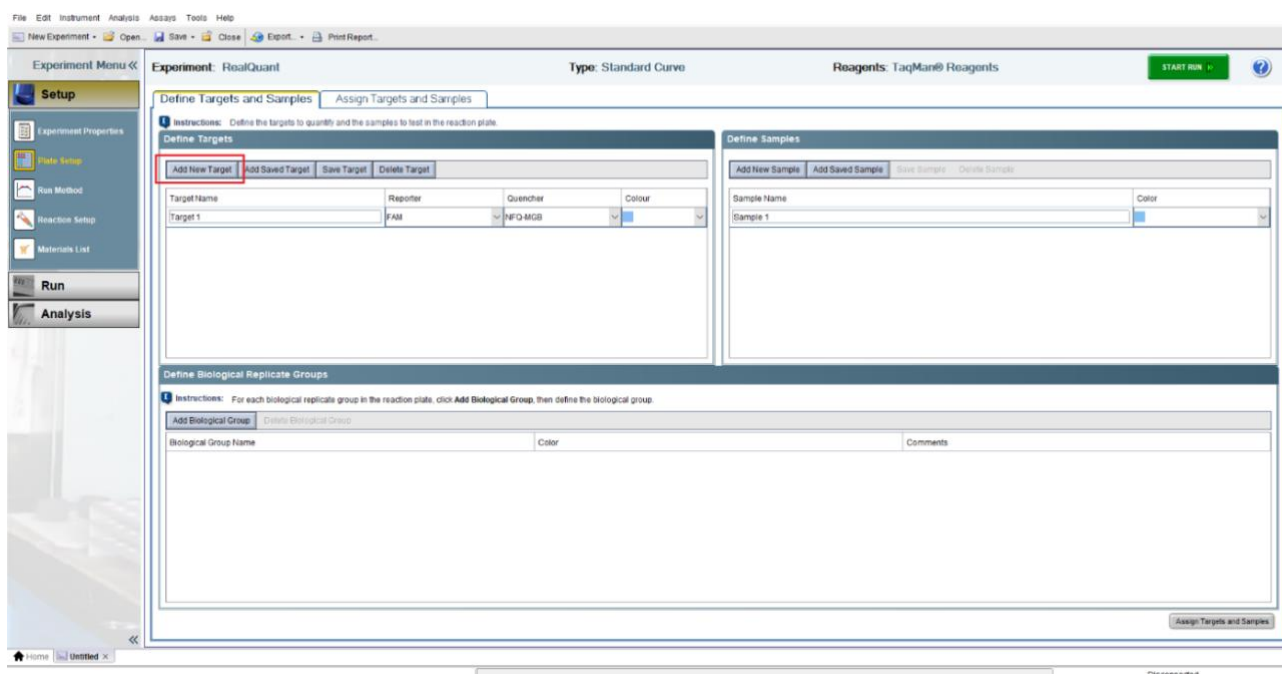


Рисунок 12

7. Обозначить мишени и выбрать для них соответствующие красители (рисунок 13).

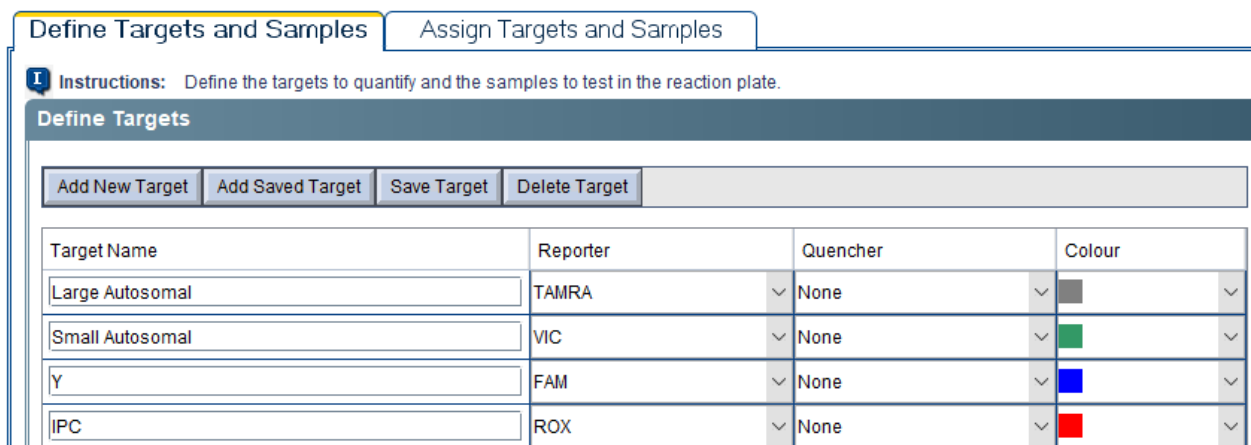


Рисунок 13

8. В разделе «**Define Samples**» к Sample 1 добавить еще пять образцов, кликая по «**Add New Sample**» (рисунок 14).

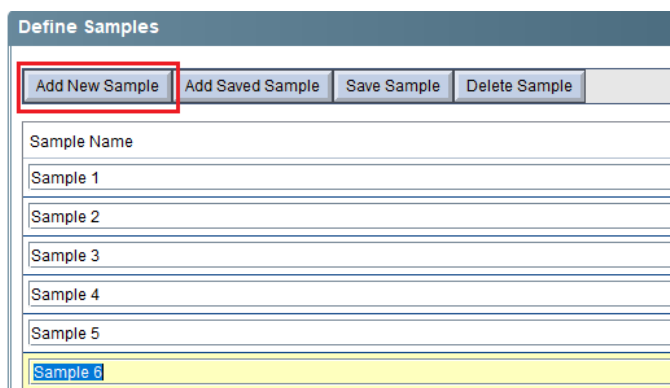


Рисунок 14

9. Переименовать образцы в **Standart 1, 2, 3, 4, 5** и **NC** (рисунок 15).

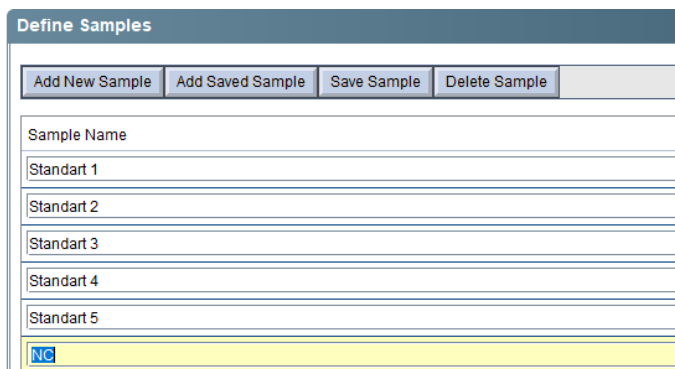


Рисунок 15

10. Перейти на вкладку «**Assign Targets and Samples**» (рисунок 16).

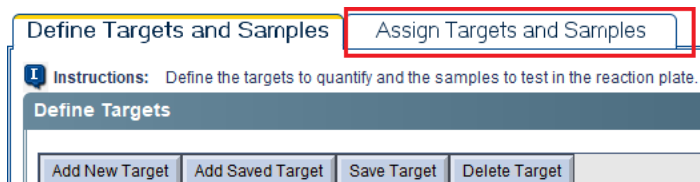


Рисунок 16

11. Расположить калибровочные образцы **St** в плашке и отметить галочками в графе «**Assign**» (рисунок 17).

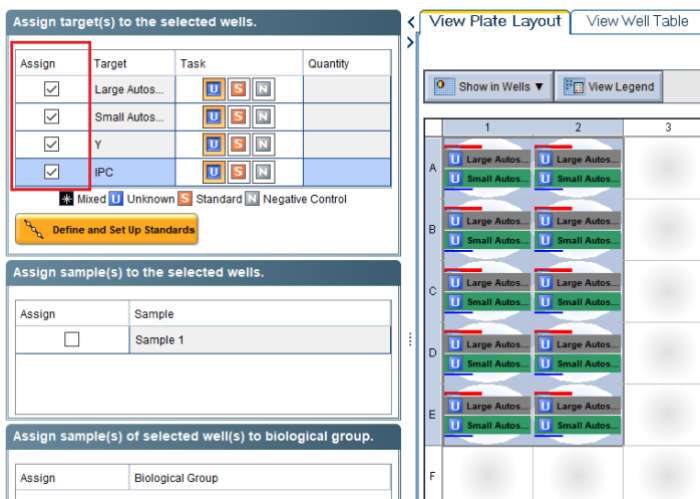


Рисунок 17

12. Отметить калибровочные образцы в графе «Task» как стандарты **S** по всем мишеням, кроме IPC. Для мишени **IPC** – оставить **U** (рисунок 18).

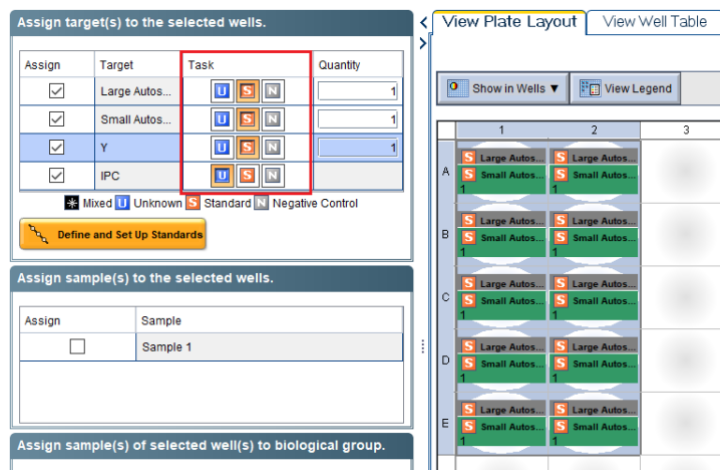


Рисунок 18

13. Выбрать повторы калибровочных образцов **St1**, задать в графе «Quantity» концентрацию **50** и присвоить в графе «Sample» название **Standard 1** (рисунок 19).

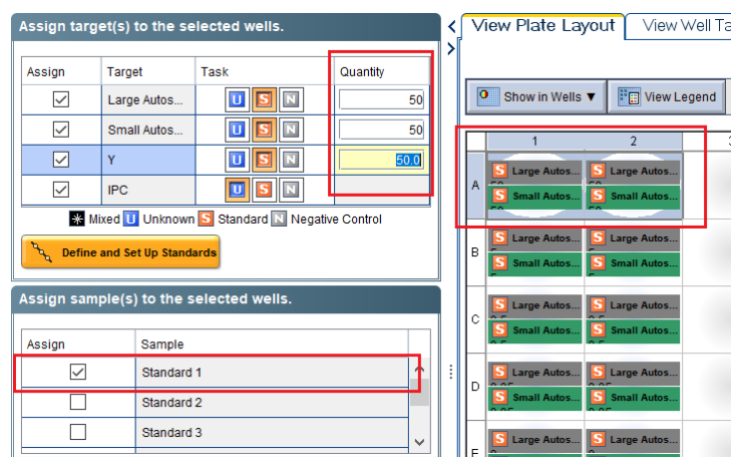


Рисунок 19

14. Задать концентрации для остальных калибровочных образцов **St2-St5** в следующем порядке: **5; 0,5; 0,05; 0,005** (рисунок 20). Присвоить названия калибровочным образцам соответственно **Standard 2, Standard 3, Standard 4, Standard 5**.

	1	2
A	Large Autos... Small Autos... 50	Large Autos... Small Autos... 50
B	Large Autos... Small Autos... 5	Large Autos... Small Autos... 5
C	Large Autos... Small Autos... 0.5	Large Autos... Small Autos... 0.5
D	Large Autos... Small Autos... 0.05	Large Autos... Small Autos... 0.05
E	Large Autos... Small Autos... 0	Large Autos... Small Autos... 0

Рисунок 20

15. Под калибровочными образцами **St** отметить отрицательные контрольные образцы ПЦР – **N**. Присвоить им название **NC** (рисунок 21).

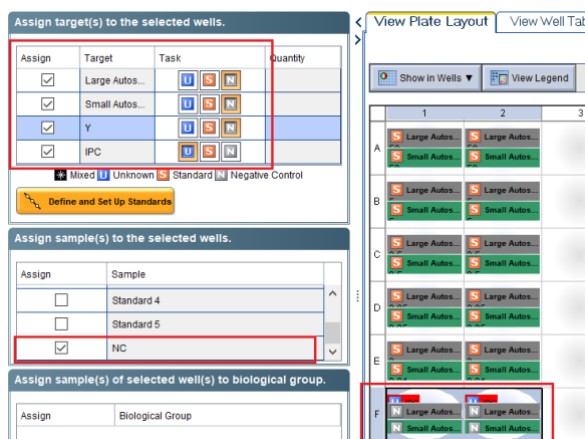


Рисунок 21

16. Выделить оставшиеся лунки плашки (рисунок 22).

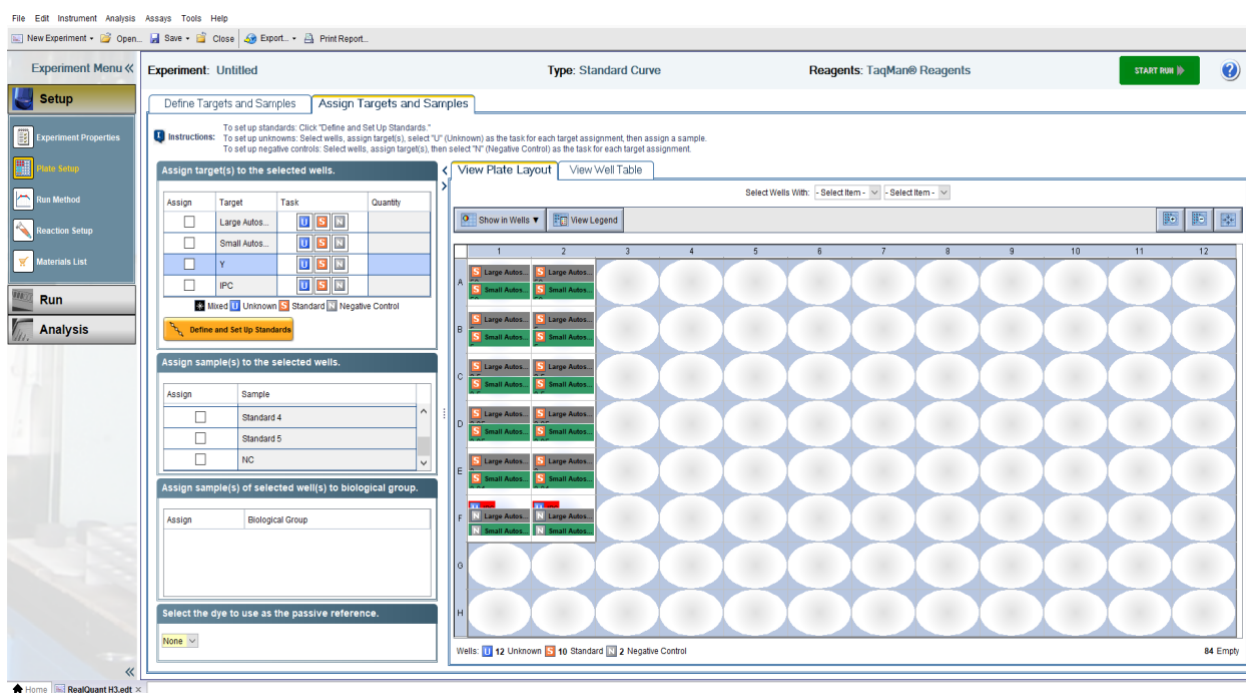


Рисунок 22

17. Отметить выделенные лунки в графе «Assign», а в графе «Task» выбрать U (исследуемые образцы) по всем мишеням (рисунок 23).

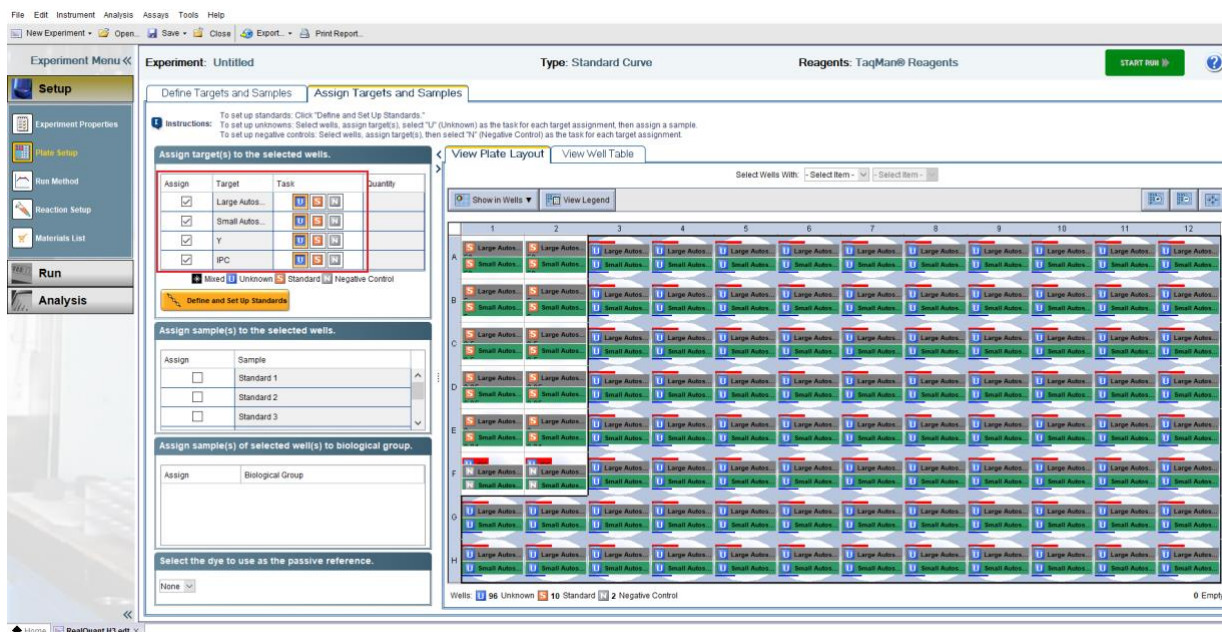


Рисунок 23

18. В графе выбора референсного красителя указать «MP» (рисунок 24).

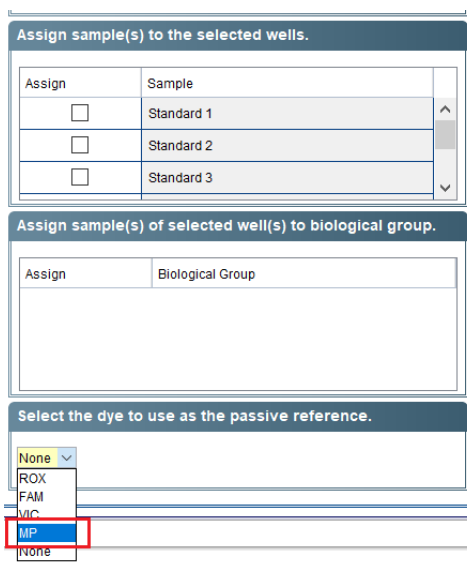


Рисунок 24

19. Перейти на вкладку «Run Method» (рисунок 25).

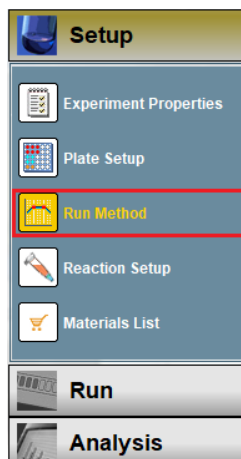


Рисунок 25

20. Установить параметры ПЦР-РВ, указанные на рисунке 26.

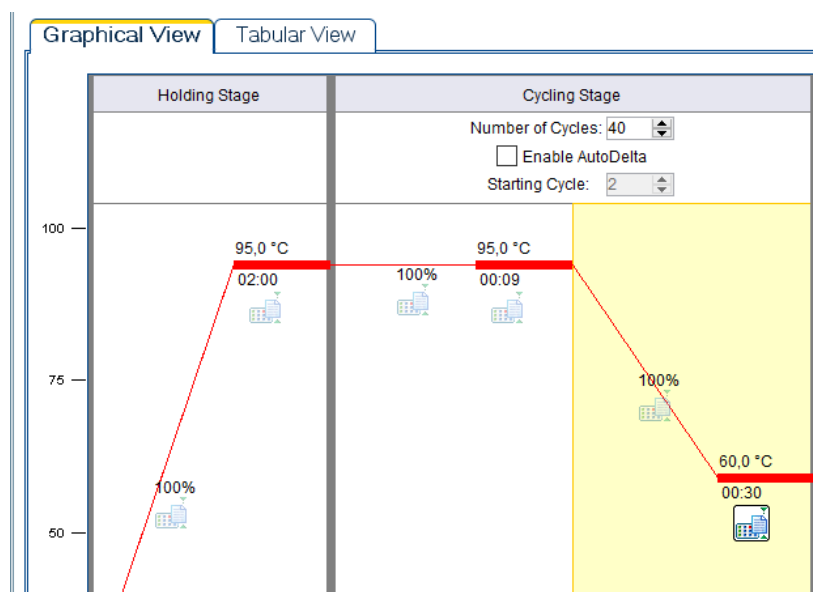


Рисунок 26

21. Кликнуть по иконке «Save» и в открывшемся списке выбрать «Save As Template» (рисунок 27).

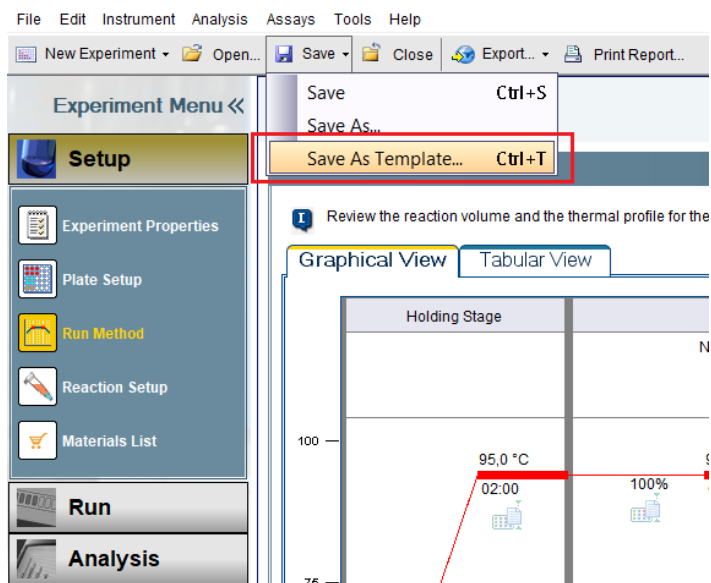


Рисунок 27

22. В появившемся окне выбрать папку «config», а в ней – папку «templates». Сохранить шаблон под названием «RealQuant H3 AB» (рисунок 28). Созданный шаблон далее используется при проведении анализа с помощью набора «RealQuant H3».

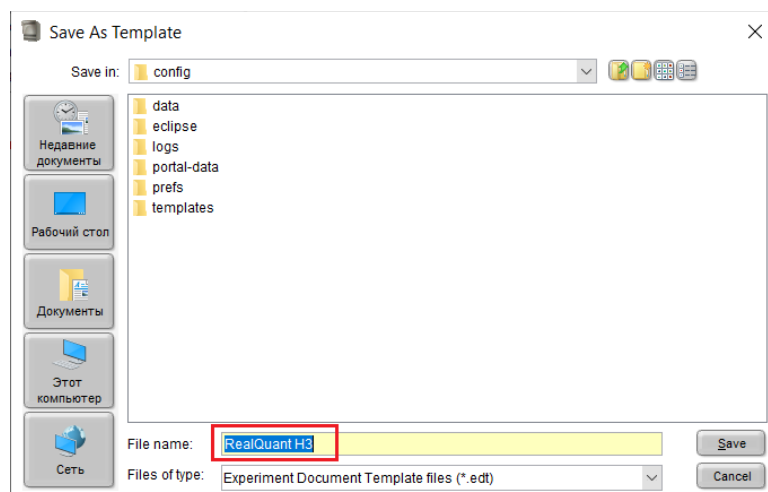


Рисунок 28

7.1.2.2. Установка готового шаблона для режима «Custom Assays»

Актуальную версию готового шаблона «RealQuant H3 AB» можно получить по запросу от производителя набора. Перед началом работы шаблон необходимо скопировать в папку «**templates**» программы **HID**, установленной на компьютере (например, локальный диск C:/Applied Biosystems/.../config/templates).

7.1.2.3. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона «RealQuant H3 AB»

1. При использовании программного обеспечения **HID** необходимо перевести программу в режим «**Custom Assays**» (рисунок 29), кликнув по соответствующей иконке (для обратного перехода в главное меню программы **HID** необходимо в левом верхнем углу в разделе «**Assays**» выбрать «**Quantifiler® Assays**»).



Рисунок 29

2. В открывшемся списке кликнуть по иконке «**Template**» (рисунок 30).

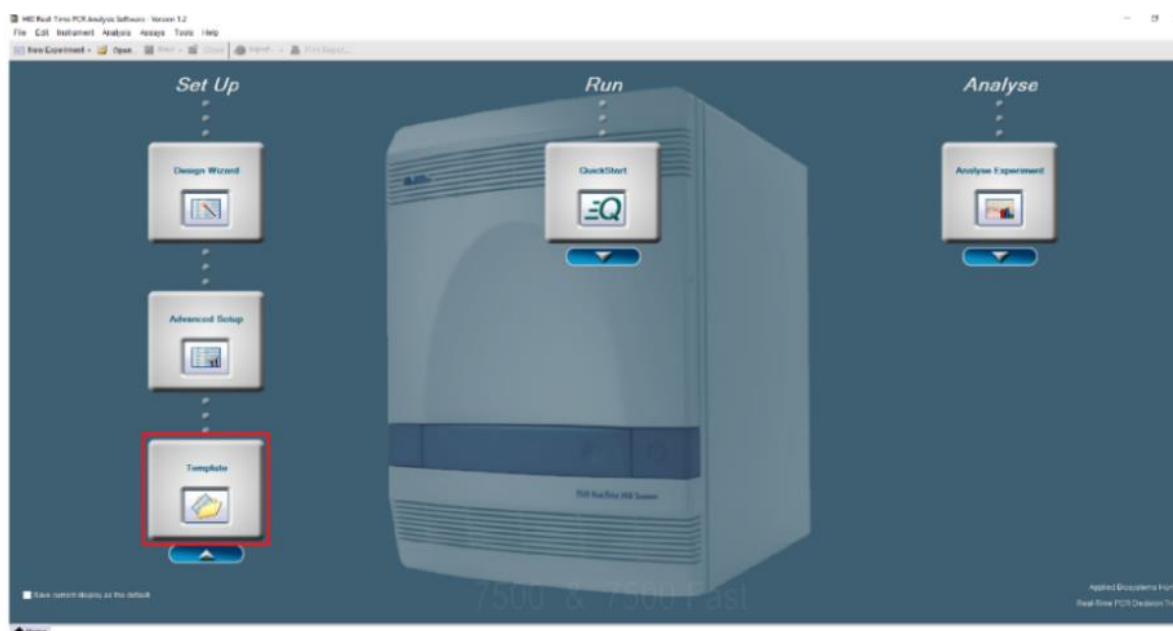


Рисунок 30

3. В открывшемся окне выбрать шаблон «**RealQuant H3 AB**» и нажать «**Open**» (рисунок 31).

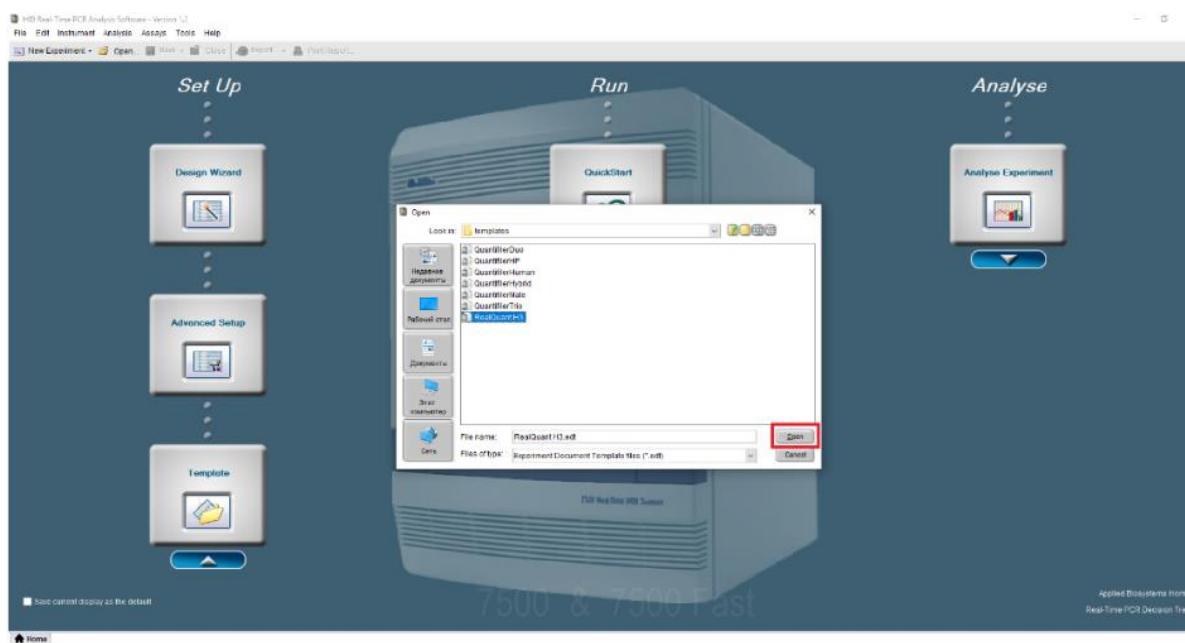


Рисунок 31

4. В открывшемся шаблоне необходимо добавить количество исследуемых образцов (рисунок 32).

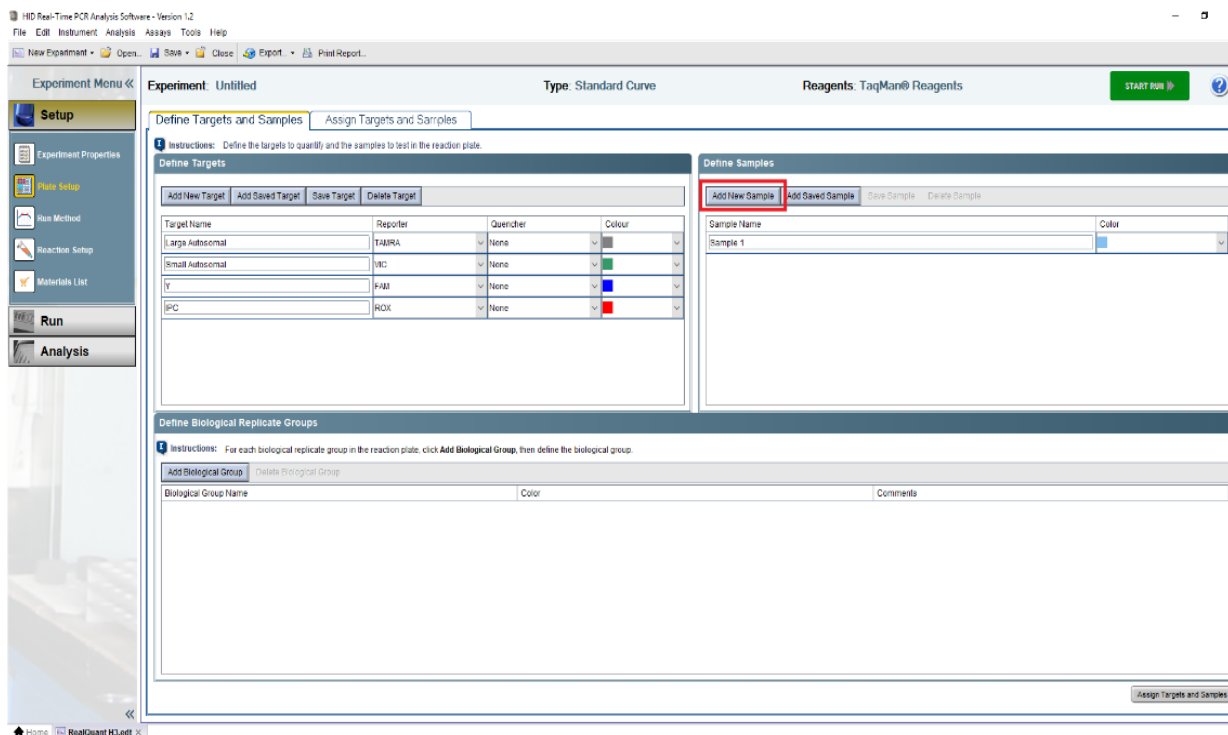


Рисунок 32

5. Перейти на вкладку «Assign Targets and Samples» (рисунок 33).

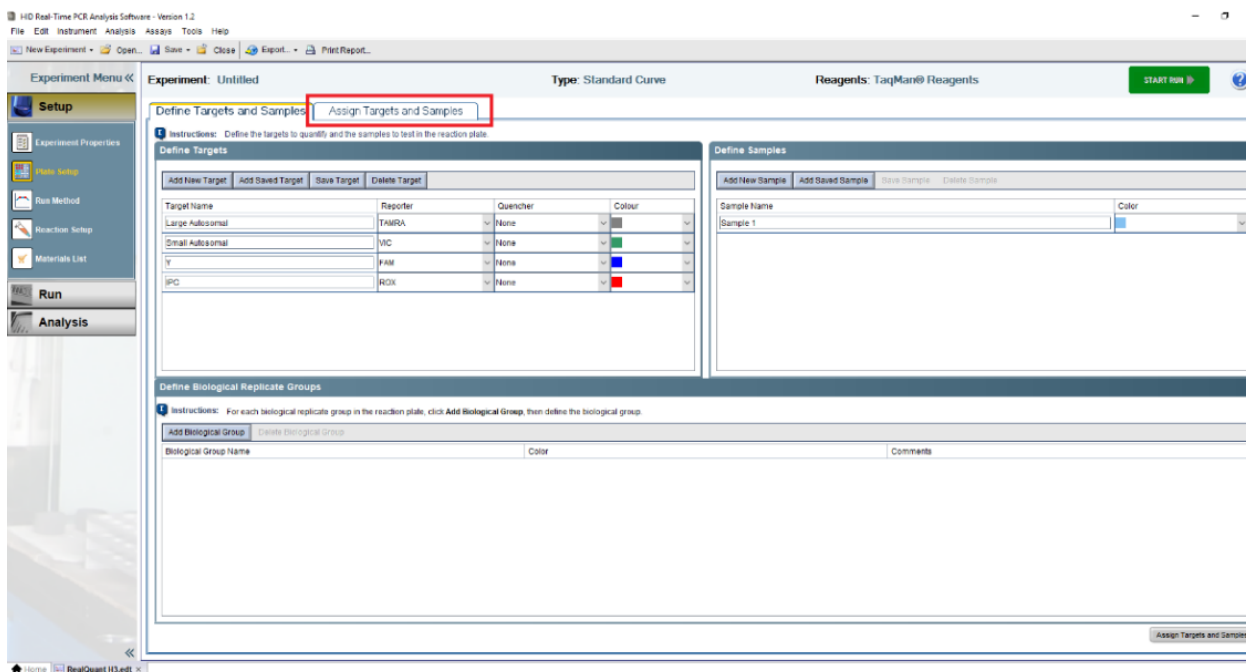


Рисунок 33

6. Отметить расположение исследуемых образцов на плашке (рисунок 34).

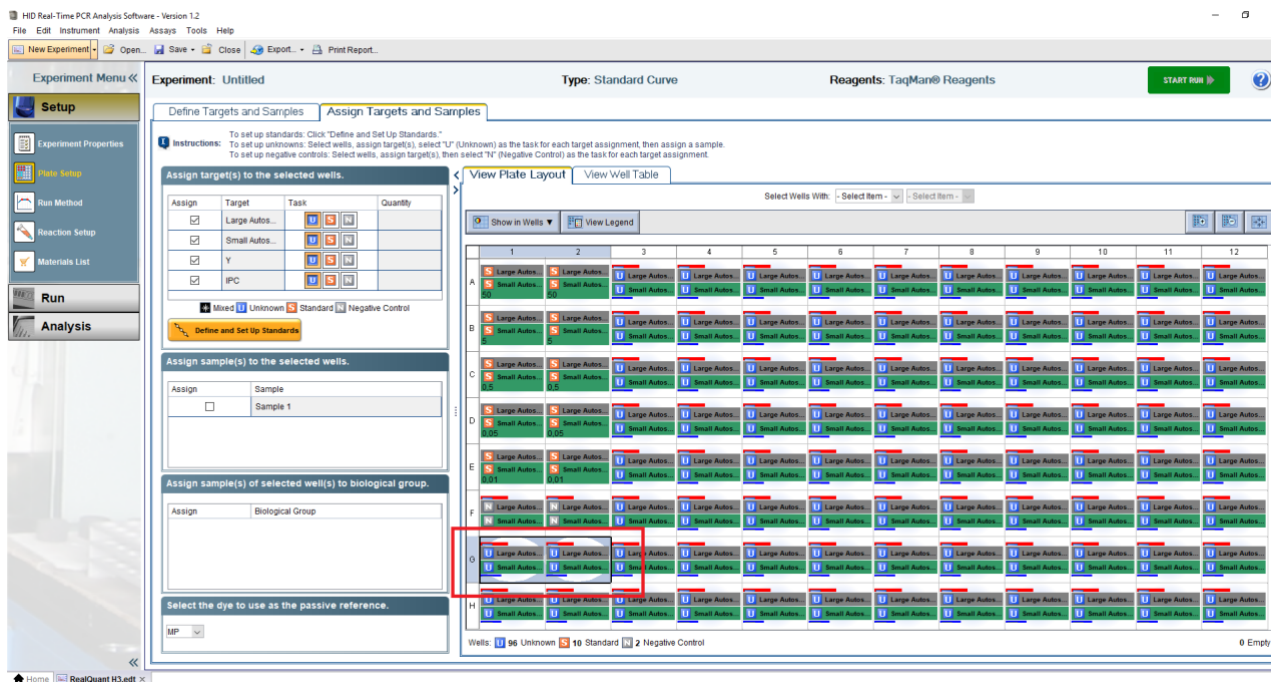


Рисунок 34

7. Внести название исследуемого образца и отметить галочку в графе «Assign» (рисунок 35).

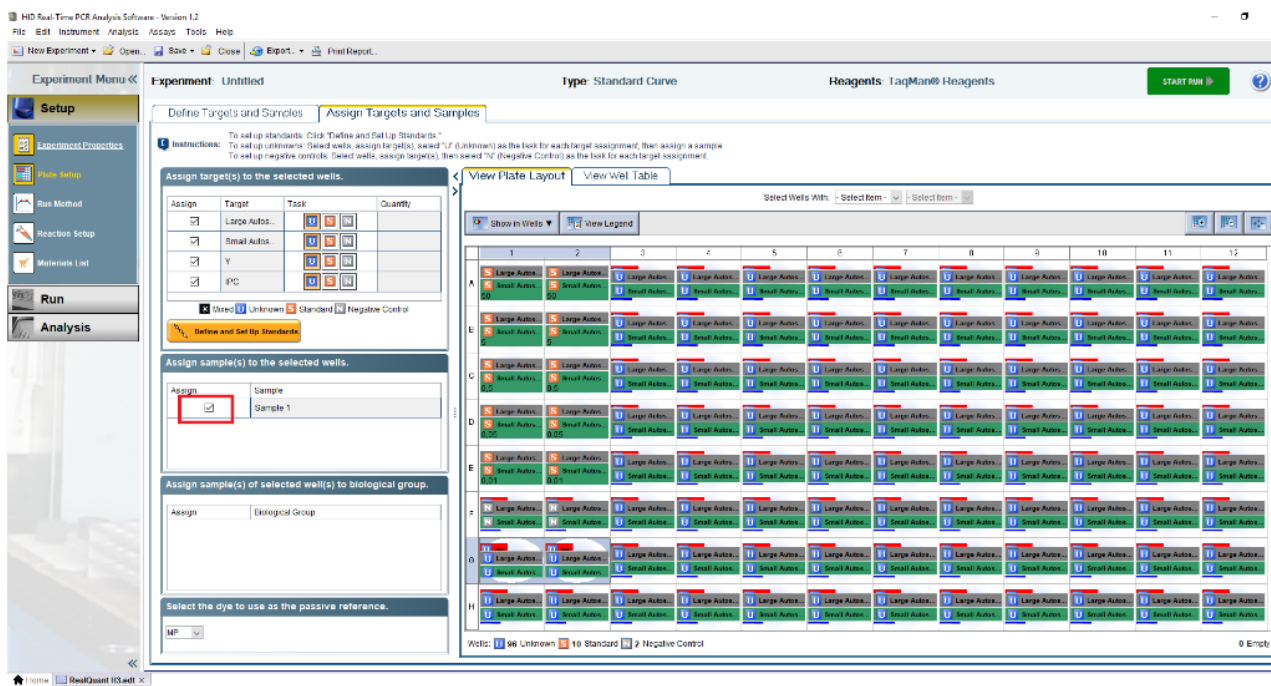


Рисунок 35

8. Очистить лунки без исследуемых образцов, выделив их и, нажав правую кнопку мыши, выбрать «Clear» (рисунок 36).

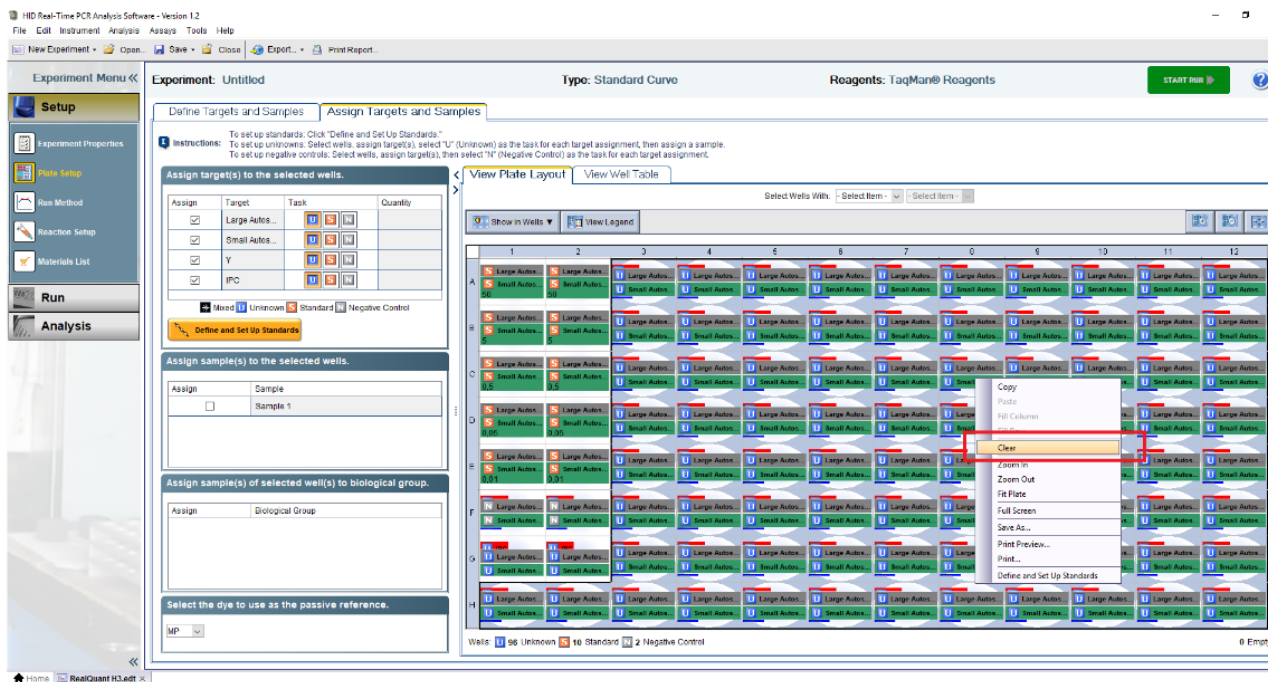


Рисунок 36

9. Нажать кнопку «**START RUN**» (рисунок 37):

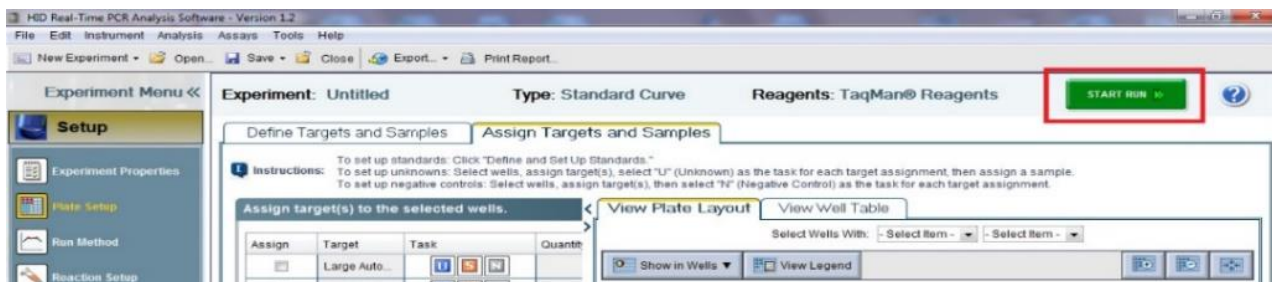


Рисунок 37

10. В появившемся окне выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «**Save**» (рисунок 38). Прибор начнет работу.

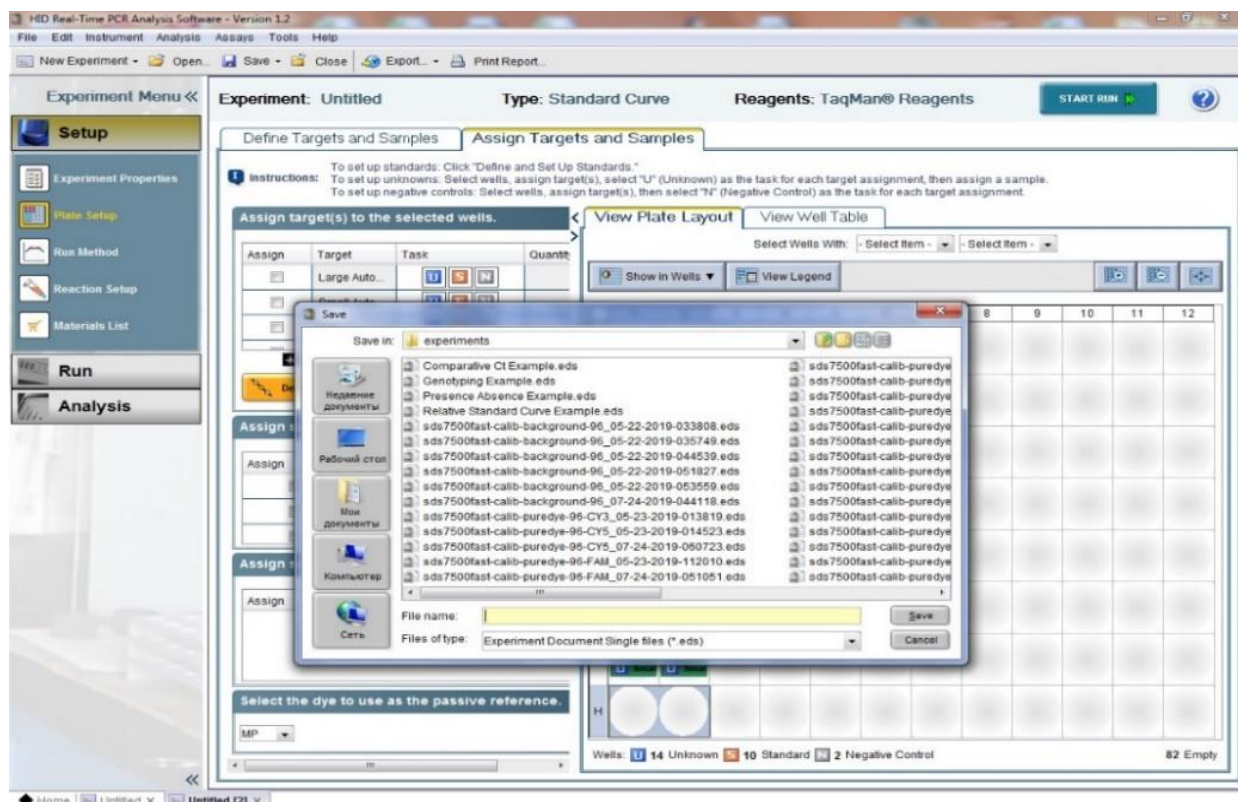


Рисунок 38

7.1.3. Заполнение названия образцов в шаблоне Excel

Для быстрого заполнения названия исследуемых образцов в программном обеспечении амплификатора 7500 Real-Time PCR System можно воспользоваться шаблоном Excel (предоставляется производителем набора).

1. Открыть шаблон Excel «Заполнение плашки RQ».
2. Указать калибровочные образцы **St** в ячейках согласно их положению в лунках подготовленной плашки (рисунок 39).

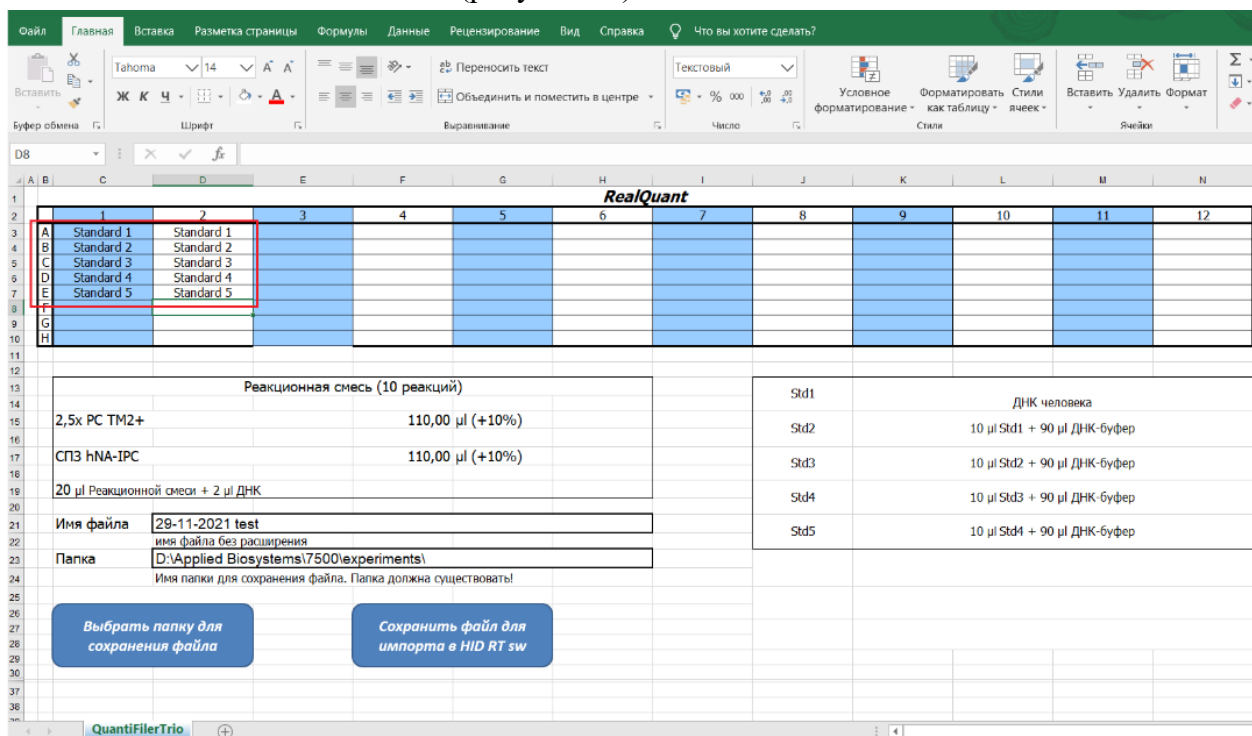


Рисунок 39

3. Согласно положению образцов в лунках подготовленной плашки указать названия исследуемых образцов (рисунок 40).

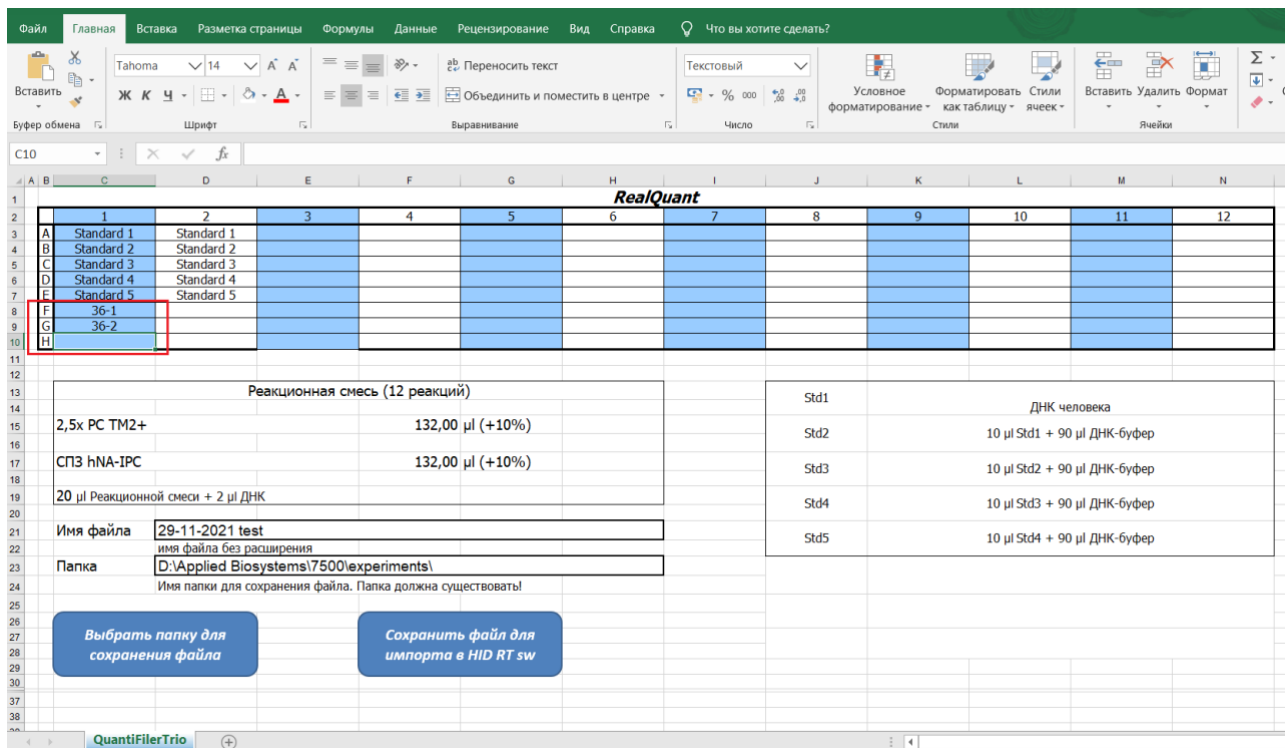


Рисунок 40

4. Указать имя файла в соответствующей строке (рисунок 41).

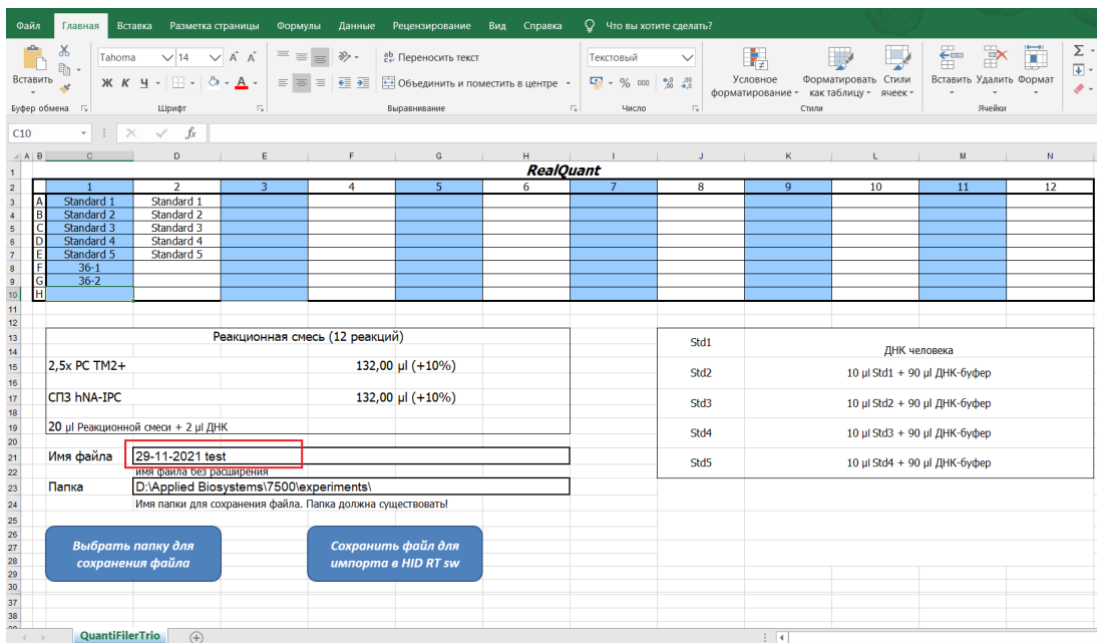


Рисунок 41

5. Выбрать папку для сохранения данных (рисунок 42).

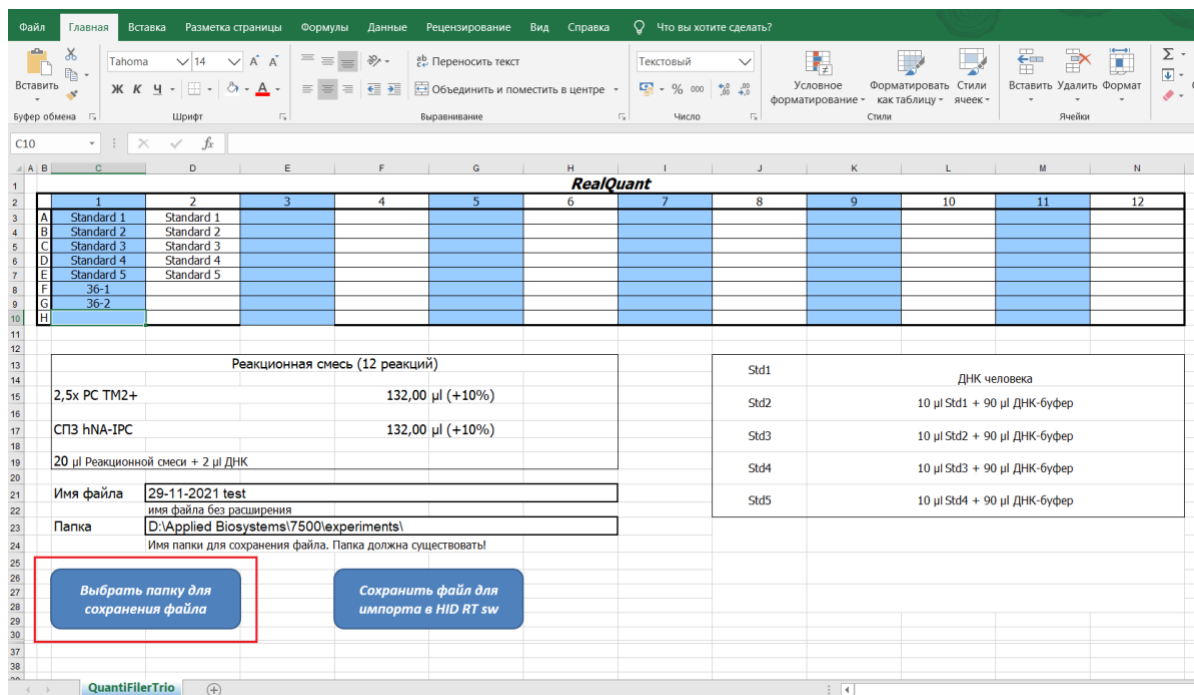


Рисунок 42

6. В открывшемся окне выбрать папку для сохранения (для легкого доступа к файлам рекомендуется выбрать папку Applied Biosystems\7500\experiments).
7. Нажать клавишу «Сохранить файл для импорта в HID RT sw».
8. Закрывать шаблон Excel «Заполнение плашки RQ».
9. В программе HID либо открыть режим «Quantifiler® Trio», либо открыть шаблон «Real Quant H3 AB», следуя пункту 7.1.2.3 «Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона «RealQuant H3 AB».
10. В верхнем меню выбрать «File» → «Import» (рисунок 43).

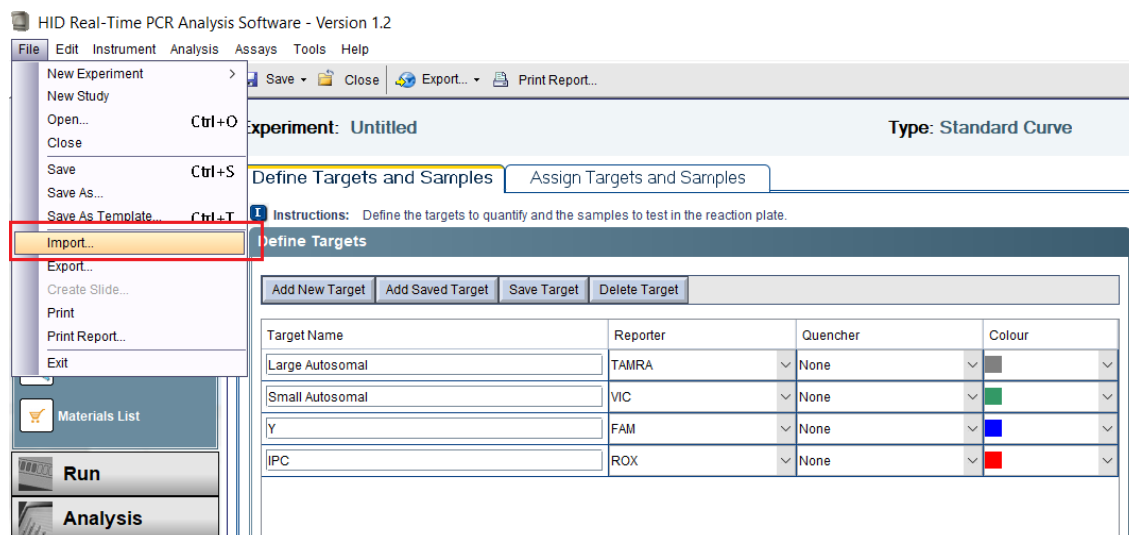


Рисунок 43

11. В открывшемся окне нажать «Browse» и выбрать сохраненный в шаблоне Excel файл данных (рисунок 44).

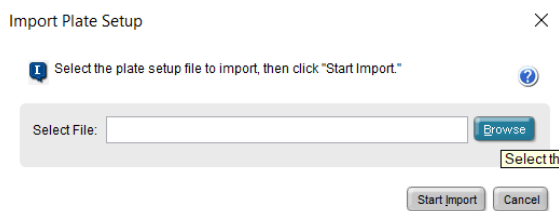


Рисунок 44

12. Нажать клавишу «**Start Import**». Файл данных загрузится в программу HID.
13. Убедиться в корректности расстановки образцов в плашке и их названии.
14. Нажать клавишу «**START RUN**».
15. В появившемся окне выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «**Save**». Прибор начнет работу.

7.2. Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе QuantStudio 5

7.2.1. Создание шаблона эксперимента

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации.
2. Открыть программу **QuantStudio™ Design & Analysis Software**.
3. Кликнуть по иконке «Создать эксперимент» (рисунок 45):

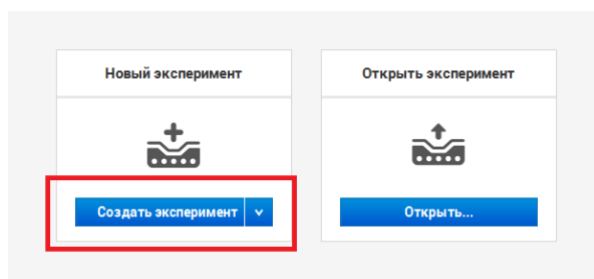


Рисунок 45

4. В открывшейся вкладке «Свойства» в графе «Название» написать имя шаблона – «**RealQuant H3 AB**» (рисунок 46).

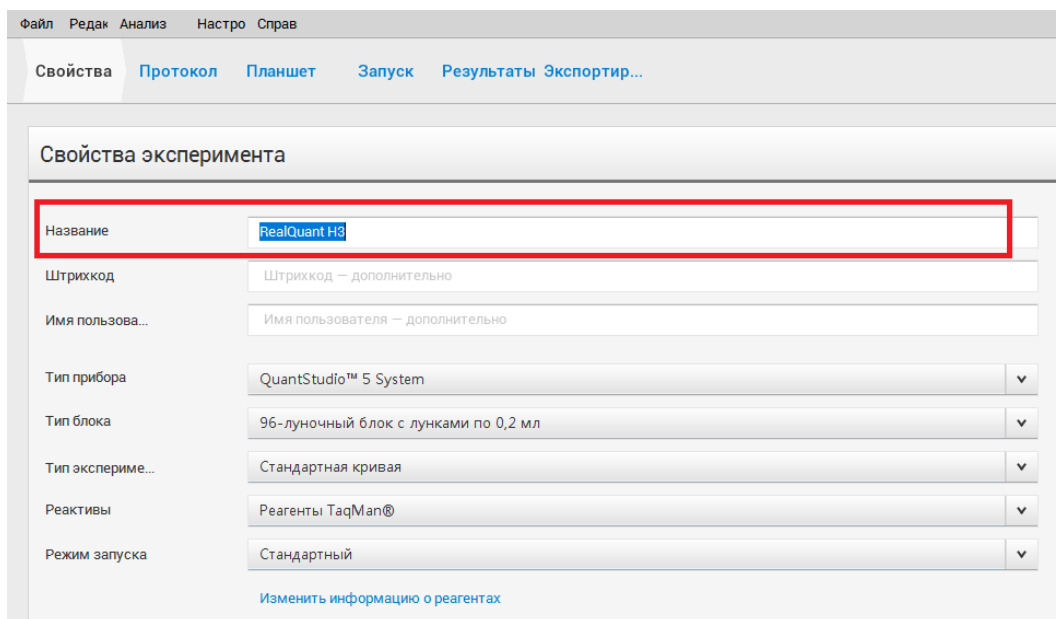


Рисунок 46

5. В правом нижнем углу нажать кнопку **Далее** .
6. Во вкладке «**Протокол**» установить параметры циклограммы, указанные на рисунке 47.

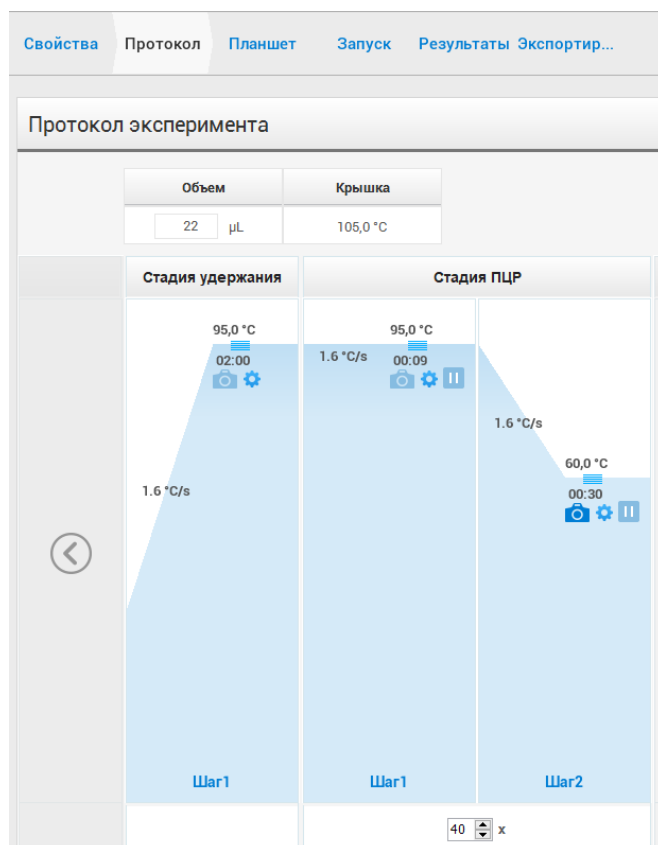


Рисунок 47

7. В правом нижнем углу нажать кнопку **Далее**.
8. В открывшейся вкладке «Планшет» в пункте «Быстрая настройка» в графе «Пассивный референсный краситель» из выпадающего списка выбрать краситель «MUSTANG PURPLE» (рисунок 48).

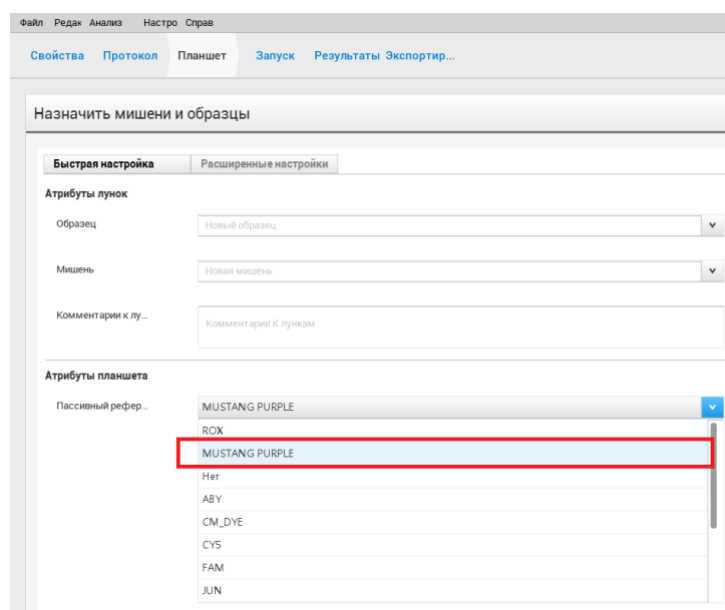


Рисунок 48

9. Перейти в пункт «Расширенные настройки». В разделе «Мишени» к существующей мишени (Target1) добавить еще три мишени, кликая по клавише «Добавить» (рисунок 49).

Назначить мишени и образцы

Быстрая настройка **Расширенные настройки**

Мишени + Добавить Действие ▾

	Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество	
☐	Target 1	FAM	NFQ-MGB		▾		✕
☐	Target 2	FAM	NFQ-MGB		▾		✕
☐	Target 3	FAM	NFQ-MGB		▾		✕

Образцы + Добавить Действие ▾

	Название образца	Комментарии	+	
☐	Sample 1			✕

Биологические группы повторностей + Добавить

	Биологическая группа	Комментарии	
--	----------------------	-------------	--

Рисунок 49

10. Обозначить мишени и выбрать для них соответствующие красители (рисунок 50).

Быстрая настройка **Расширенные настройки**

Мишени + Добавить Действие ▾

	Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество	
☐	Large Autosomal	TAMRA	None		▾		✕
☐	Small Autosomal	VIC	None		▾		✕
☐	Y	FAM	None		▾		✕
☐	IPC	ROX	None		▾		✕

Рисунок 50

11. В разделе «Образцы» к Sample 1 добавить еще пять образцов, кликая по «Добавить» (рисунок 51).

Быстрая настройка **Расширенные настройки**

Мишени + Добавить Действие ▾

	Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество	
☐	Small Autosomal	VIC	None		▾		✕
☐	Y	FAM	None		▾		✕
☐	IPC	ROX	None		▾		✕

Образцы + Добавить Действие ▾

	Название образца	Комментарии	+	
☐	Sample 1			✕

Рисунок 51

12. Переименовать образцы в **Standart 1, 2, 3, 4, 5** и **NC** (рисунок 52).

Образцы		Добавить	Действие
	Название образца	Комментарии	+
☐	Standart 1		
☐	Standart 2		
☐	Standart 3		
☐	Standart 4		
☐	Standart 5		
☐	NC		

Рисунок 52

13. Расположить калибровочные образцы (стандарты) **St** в плашке и назначить все 4 мишени (рисунок 53).

Быстрая настройка

Расширенные настройки

Мишени

Добавить

Действие

	Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество
☒	Large Autosomal	TAMRA	None		U	X
☒	Small Autosomal	VIC	None		U	X
☒	Y	FAM	None		U	X

Образцы

Добавить

Действие

	Название образца	Комментарии	+
☐	Standart 1		
☐	Standart 2		

Биологические группы повторностей

Добавить

Просмотр

	1	2
A	U Large Au	U Large Au
B	U Large Au	U Large Au
C	U Large Au	U Large Au
D	U Large Au	U Large Au
E	U Large Au	U Large Au
F	U Large Au	U Large Au

Рисунок 53

14. Отметить калибровочные образцы в графе «Задача» как стандарты **S** по всем мишеням, кроме IPC. Для мишени **IPC** – оставить **U** (рисунок 54).

Быстрая настройка

Расширенные настройки

Мишени

Добавить

Действие

	Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество
☒	Small Autosomal	VIC	None		S	1.0
☒	Y	FAM	None		S	1.0
☒	IPC	ROX	None		U	X

Образцы

Добавить

Действие

	Название образца	Комментарии	+
☐	Standart 1		
☐	Standart 2		

Биологические группы повторностей

Добавить

Просмотр

	1	2
A	S Large Au	S Large Au
B	S Large Au	S Large Au
C	S Large Au	S Large Au
D	S Large Au	S Large Au
E	S Large Au	S Large Au
F	S Large Au	S Large Au

Рисунок 54

15. Выбрать повторы калибровочных образцов **St1**, задать в графе «**Количество**» концентрацию **50** и присвоить в графе «**Название образца**» название **Standard 1** (рисунок 55).

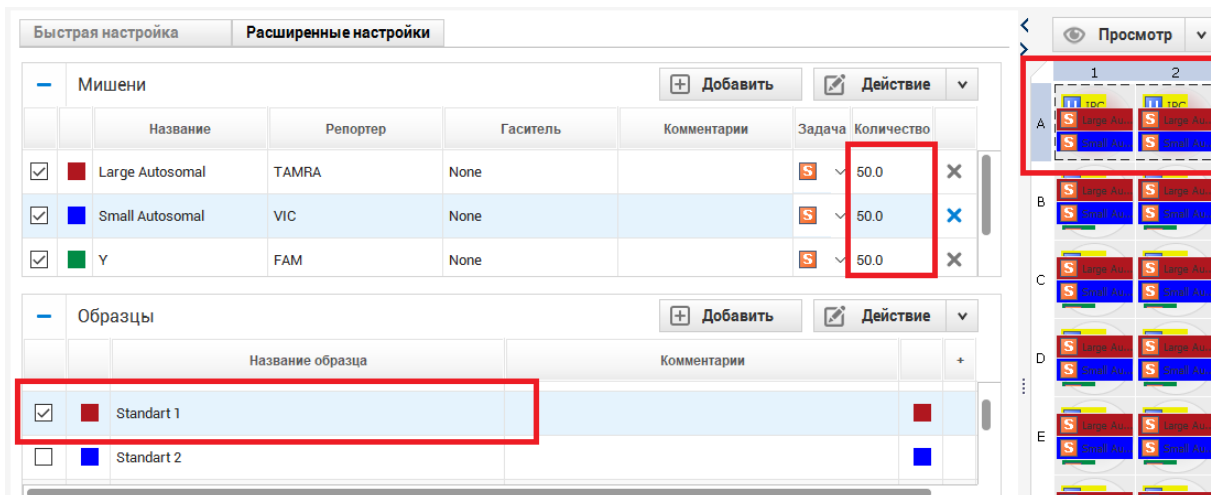


Рисунок 55

16. Задать концентрации для остальных калибровочных образцов **St2-St5** в следующем порядке: **5; 0,5; 0,05; 0,005**. Присвоить названия калибровочным образцам соответственно **Standard 2, Standard 3, Standard 4, Standard 5**.
17. Под калибровочными образцами **St** отметить отрицательные контрольные образцы ПЦР – **N** (рисунок 56). Присвоить им название **NC**.

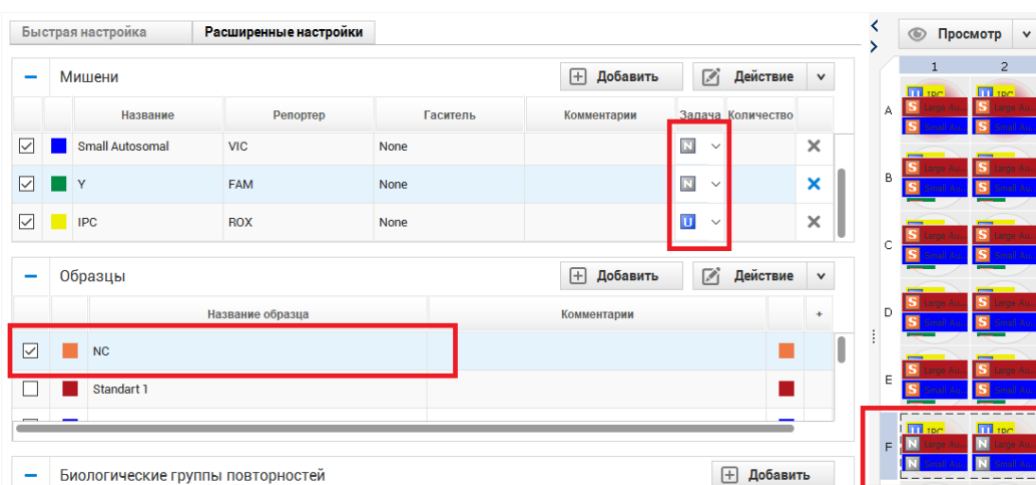


Рисунок 56

18. В верхнем меню выбрать «**Файл**» → «**Сохранить как**» (рисунок 57).

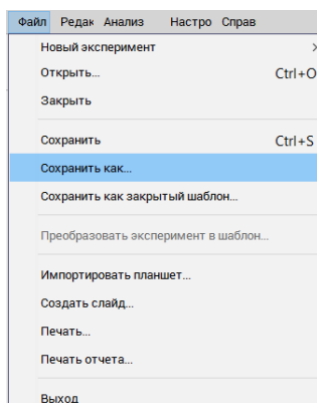


Рисунок 57

19. В появившемся окне выбрать папку «**templates**» в директории программы **QuantStudio™ Design & Analysis Software** (например, диск C:/Program Files/Applied Biosystems/ QuantStudio Design & Analysis Software/templates) (рисунок 58).

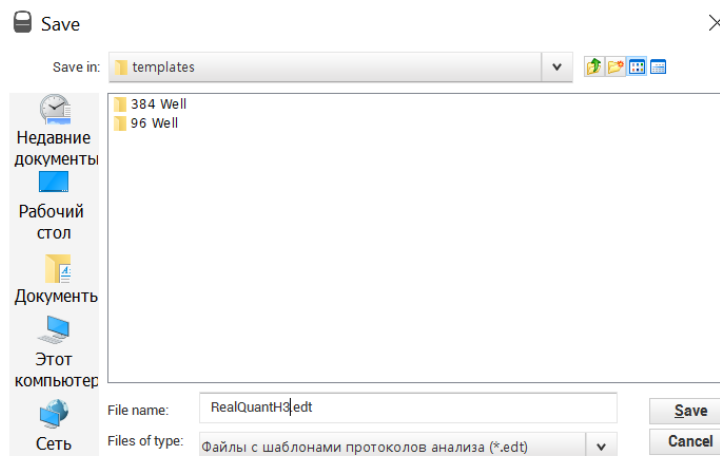


Рисунок 58

20. Сохранить шаблон под названием «**RealQuant H3 AB**», нажав на кнопку «**Save**». Созданный шаблон далее используется при проведении анализа с помощью набора «**RealQuant H3 AB**».

7.2.2. Установка готового шаблона

Актуальную версию готового шаблона «**RealQuant H3 AB**» можно получить по запросу от производителя набора. Перед началом работы шаблон необходимо скопировать в папку templates программы **QuantStudio Design & Analysis Software**, установленной на компьютере (например, локальный диск C:/Applied Biosystems/templates).

7.2.3. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона «RealQuant H3 AB»

1. Открыть программу **QuantStudio™ Design & Analysis Software**.
2. В центре экрана, в разделе «**Новый эксперимент**» выбрать «**Создать эксперимент**» → «**Шаблон**» (рисунок 59).

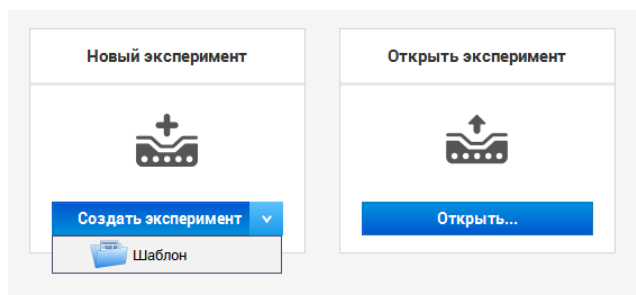


Рисунок 59

3. В открывшемся окне выбрать шаблон «**RealQuant H3 AB**» и перейти на вкладку «**Планшет**» в пункт «**Расширенные настройки**» (рисунок 60).

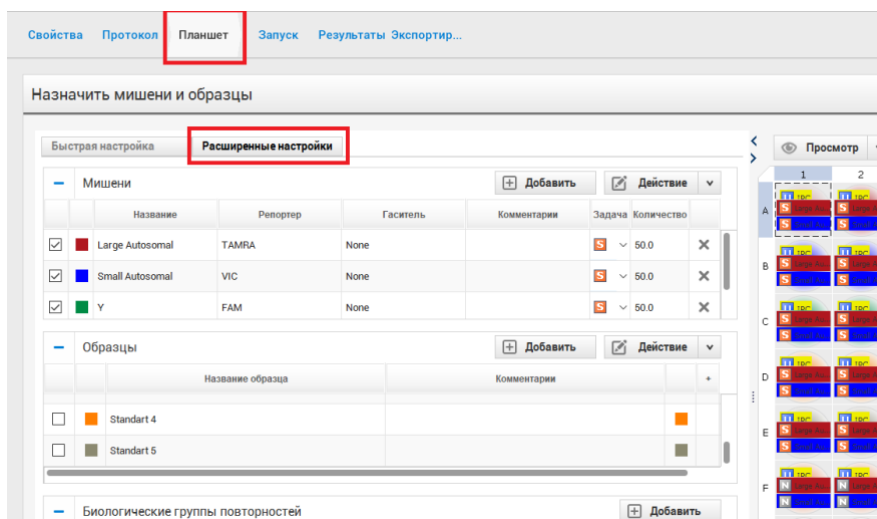


Рисунок 60

4. Добавить количество исследуемых образцов в разделе «Образцы» (рисунок 61).



Рисунок 61

5. Применить название исследуемого образца к конкретной лунке плашки (рисунок 62).

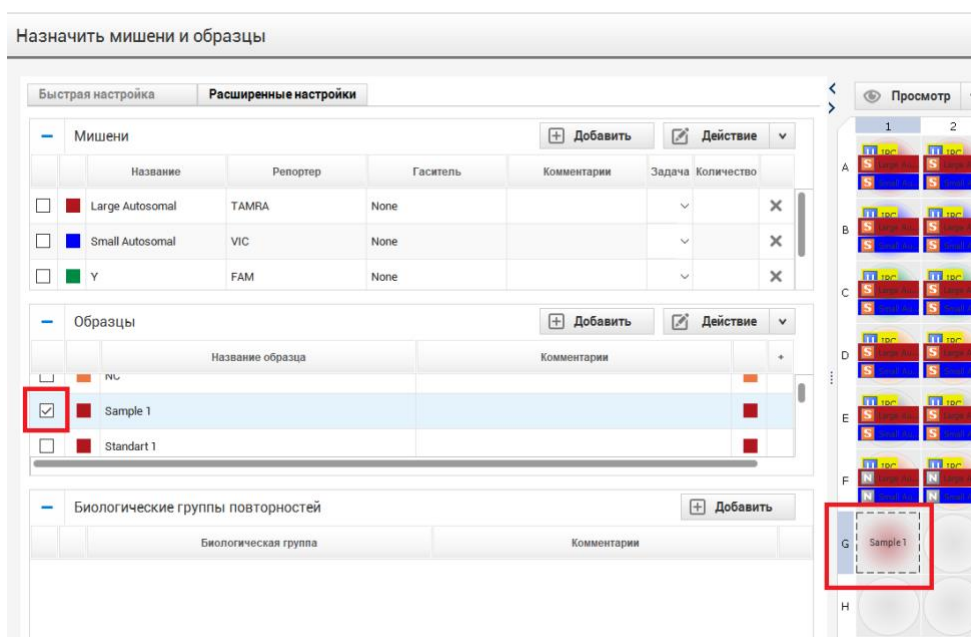


Рисунок 62

6. Назначить мишени для исследуемого образца (рисунок 63).

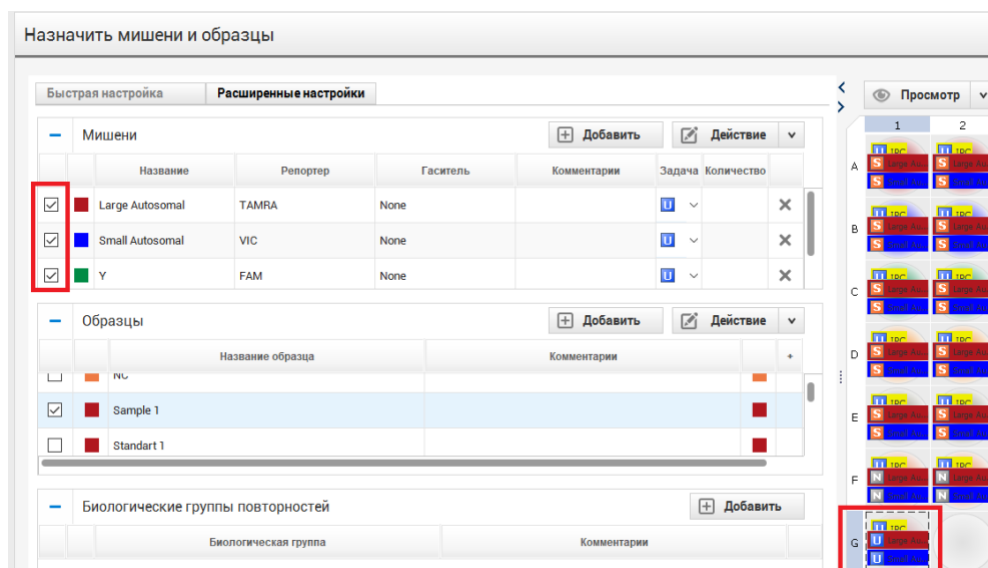


Рисунок 63

7. Перейти на вкладку «Запуск» и нажать клавишу «Начать прогон».
8. В появившемся окне выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «Save». Прибор начнет работу.

8. АНАЛИЗ ДАННЫХ

8.1. Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio»

8.1.1. Обработка результатов

1. Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **HID**.
2. Кликнуть по иконке «**Standard Curve**» во вкладке **Analysis** (рисунок 64).



Рисунок 64

3. Во всплывшем окне в графе «**Target**» последовательно открыть калибровочную кривую для каждой мишени (рисунок 65).

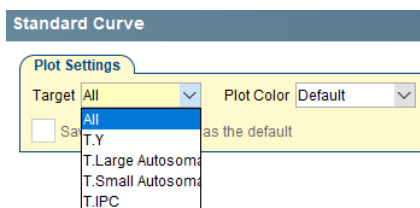


Рисунок 65

4. Убедиться, что параметры каждой калибровочной кривой (рисунок 66) соответствуют значениям:
 - коэффициент корреляции **R²** не ниже **0,99**;
 - наклон калибровочной кривой **Slope** от **-3,3** до **-3,6**.

ВАЖНО! Если параметры калибровочной кривой не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными St. Если параметры калибровочной кривой снова не будут соответствовать требуемым значениям, приготовить новые калибраторы и провести ПЦР-РВ. **Использовать для количественного анализа калибровочную кривую с параметрами, не соответствующими требуемым критериям, запрещено.**

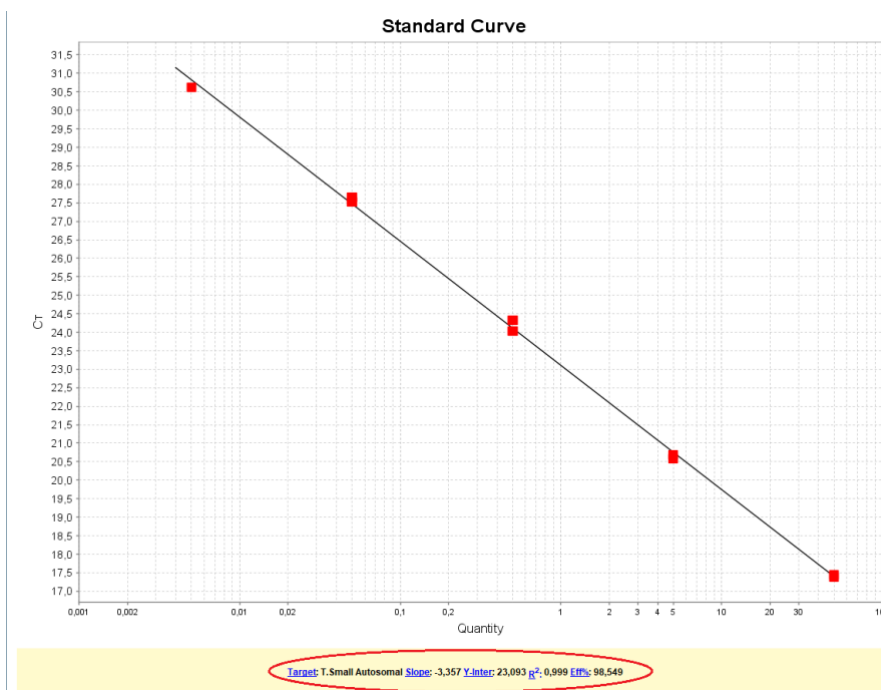


Рисунок 66

5. Перейти к анализу данных в разделе «**View Well Table**».
6. Оценить результаты прохождения NC в соответствии с таблицей 6 раздела 9 «Интерпретация результатов».

ВАЖНО! Если результаты прохождения NC не соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными St. Повторное получение неудовлетворительных результатов для NC может свидетельствовать о контаминации реагентов.

Если параметры калибровочной кривой соответствуют указанным критериям, и результаты прохождения NC соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, перейти к п. 7.

7. Оценить значения в столбце **Quantity** и **Ст** по каждой мишени (**T.Small autosomal**, **T.Large autosomal**, **T.Y**, **T.IPC**) для каждого исследуемого образца в соответствии с разделом 9 «Интерпретация результатов».

Концентрация геномной ДНК определяется по короткому фрагменту аутосомной ДНК – значение **Quantity** мишени **T.Small autosomal** в таблице «**View Well Table**».

Расчет индекса деградации ДНК в образце осуществляется автоматически. Значение индекса деградации находится в столбце «**Mean Degradation Index**».

Половая принадлежность определяется наличием или отсутствием амплификации фрагмента Y-хромосомы. Проанализировать значения **Ст** мишени **T.Y** в таблице «**View Well Table**» согласно разделу 9 «Интерпретация результатов».

Значение соотношения мужской и женской ДНК рассчитывается автоматически и находится в столбце «**Mean M:F Ratio**».

Оценка ингибирования определяется по значению **Ст** внутреннего положительного контроля – **T.IPC**, согласно разделу 9 «Интерпретация результатов».

8.1.2. Виртуальная калибровочная кривая

В программном обеспечении HID версии 1.3 и выше при работе в вкладке «**Quantifiler Trio**» предусмотрена возможность сохранения параметров калибровочной кривой (создание

так называемой «Виртуальной калибровочной кривой») с возможностью их применения к образцам из других постановок ПЦР в реальном времени.

При получении реагентов одной серии возможно получить стандартную кривую при первой постановке, а в последующих использовать ее значения, не используя стандартные образцы в постановке ПЦР-РВ.

ВАЖНО! Запрещено использовать внутреннюю калибровочную кривую, полученную при постановке ПЦР-РВ с одной серией набора, для расчета концентрации ДНК в постановке ПЦР-РВ с использованием другой серии набора.

ВАЖНО! При применении виртуальной калибровочной кривой использовать стандартные образцы для ПЦР в реальном времени не требуется. Для контроля точности определения концентрации рекомендуется калибровочный образец St2 амплифицировать в качестве образца.

8.1.2.1. Создание виртуальной калибровочной кривой

1. Убедиться, что параметры сохраняемой калибровочной кривой соответствуют значениям:

- коэффициент корреляции R^2 не ниже **0,99**;
- наклон калибровочной кривой от **-3,3 до -3,6**.

ВАЖНО! Если параметры калибровочной кривой не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными St. Если параметры калибровочной кривой снова не будут соответствовать требуемым значениям, приготовить новые калибраторы и провести ПЦР-РВ. **Использовать для количественного анализа калибровочную кривую с параметрами, не соответствующими требуемым критериям, запрещено.**

2. Записать значения **Y-Intercept** и **Slope** для калибровочной кривой каждой мишени.
3. Перейти в раздел «**Virtual Standard Curve**» и кликнуть по клавише «**AddVirtual Curve to Experiment**» (рисунок 67).

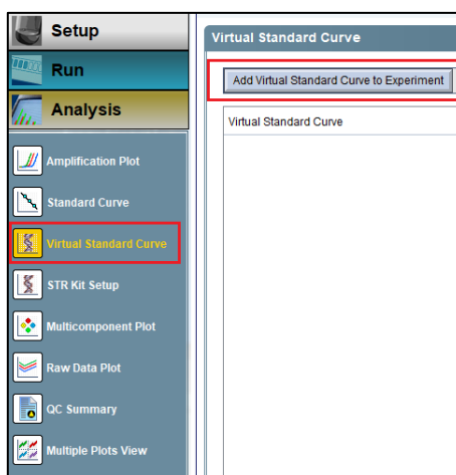


Рисунок 67

4. В открывшемся окне нажать «**New**» (рисунок 68).

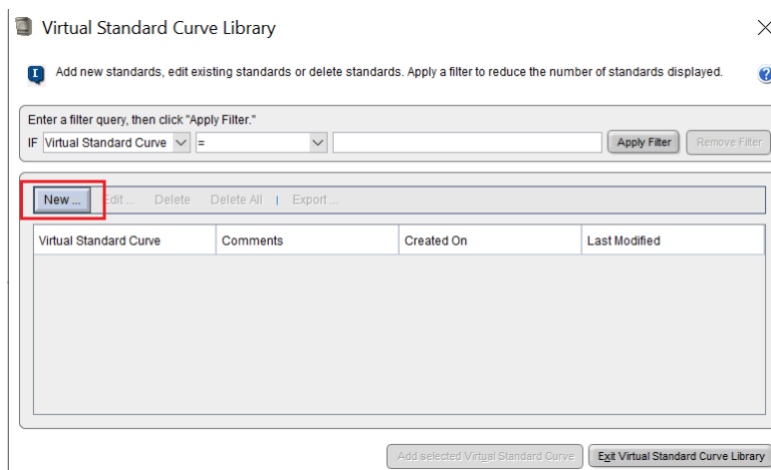


Рисунок 68

- Затем в графе «**Virtual Standard Curve**» (рисунок 69) ввести название стандартной кривой, например, RealQuant 031025 (где цифры означают серию наборов, к которым применима данная виртуальная кривая). В разделе «**Targets**» ввести значения **Y-Intercept** и **Slope** для калибровочной кривой каждой мишени.

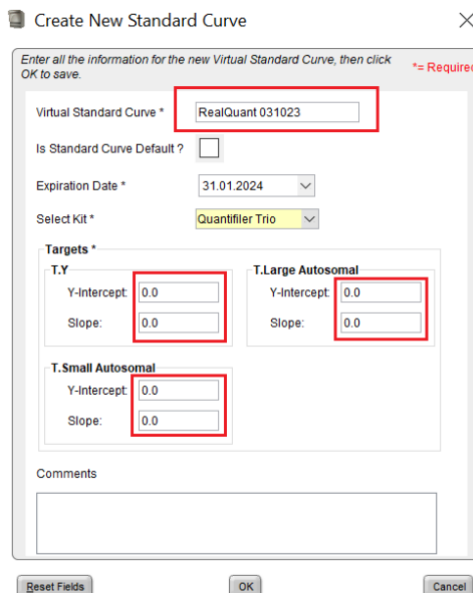


Рисунок 69

- Нажать «**OK**» для сохранения калибровочной кривой.

8.1.2.2. Применение виртуальной калибровочной кривой

- Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **HID**.
- Перейти в раздел «**Virtual Standard Curve**» и кликнуть по клавише «**AddVirtual Curve to Experiment**» (рисунок 70).

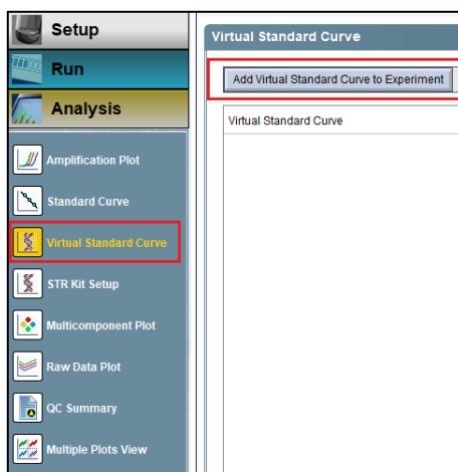


Рисунок 70

3. В открывшемся окне выбрать виртуальную калибровочную кривую и нажать «**Add selected Standard Curve**» (рисунок 71). Виртуальная калибровочная кривая будет применена к эксперименту.

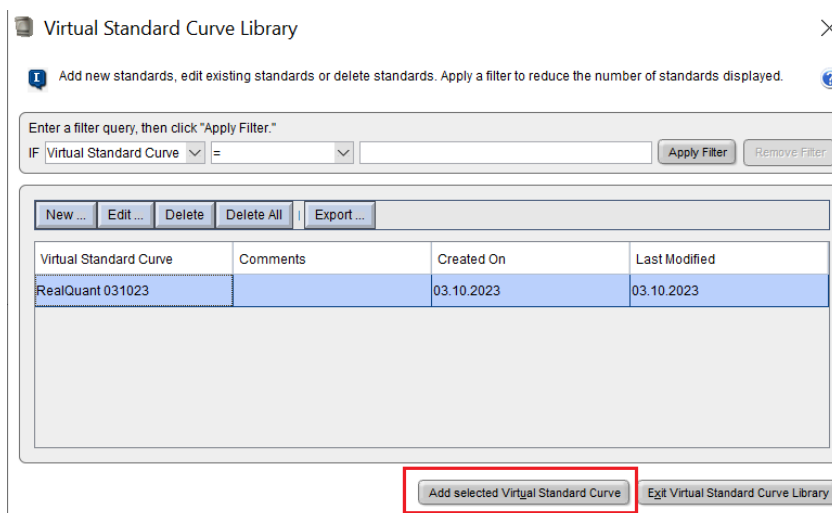


Рисунок 71

8.2. Программное обеспечение HID в режиме «Custom Assay»

8.2.1. Обработка результатов

1. Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **HID**. Перевести программу в режим «**Custom Assays**», кликнув по соответствующей иконке (см. рисунок 29).
2. При анализе в программе **HID** данных, полученных с использованием набора «**RealQuant H3**» впервые, возможно несоответствие шкалы уровня флуоресценции (ΔR_n) на амплификационном графике уровню флуоресценции полученных данных, в результате чего кривые амплификации будут не видны. Для визуализации кривых амплификации необходимо:
 - Кликнуть по иконке «**Plot properties**» (рисунок 72).

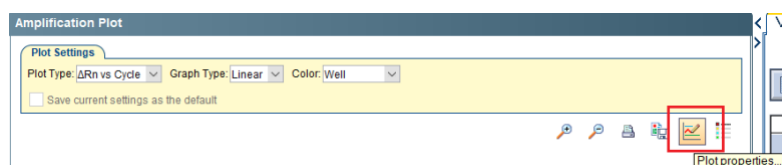


Рисунок 72

- В появившемся окне выбрать вкладку «Y-Axis» (рисунок 73).

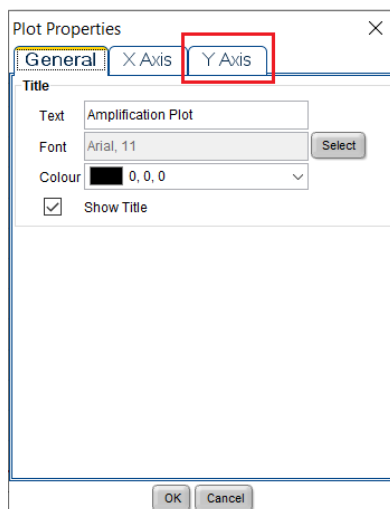


Рисунок 73

- В графе «Maximum value» установить значение **10** и нажать **ОК** (рисунок 74). Амплификационные кривые станут видны на графике.

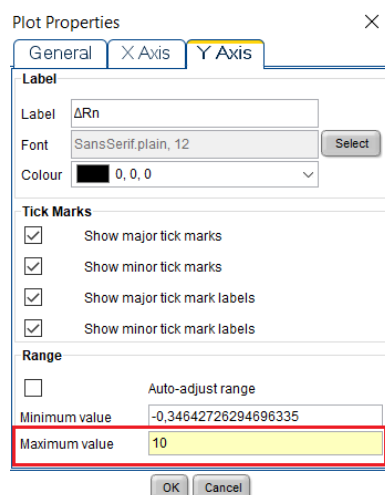


Рисунок 74

3. Оценить **калибровочные образцы (St)** и калибровочную кривую:

- Кликнуть по иконке «Standard Curve» во вкладке «Analysis» (рисунок 75).

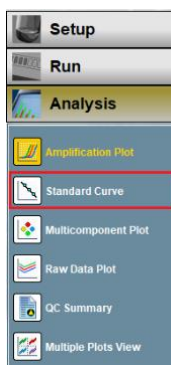


Рисунок 75

- В появившемся окне оценить параметры калибровочных кривых по каждой мишени (рисунок 76).

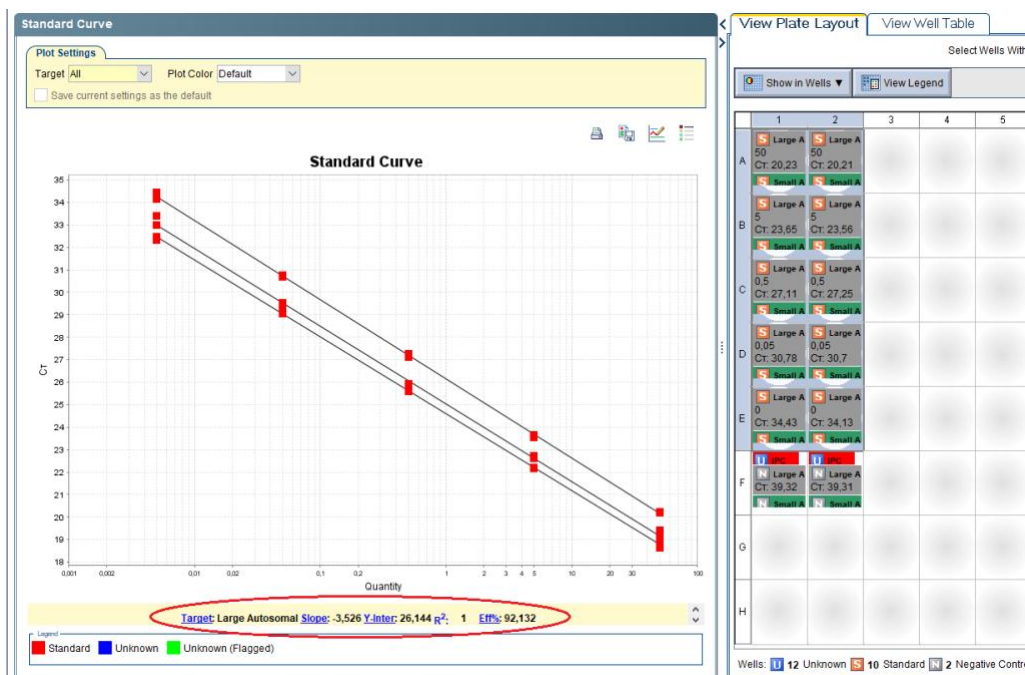


Рисунок 76

- В графе «Target» последовательно открыть калибровочную кривую для каждой мишени (рисунок 77).

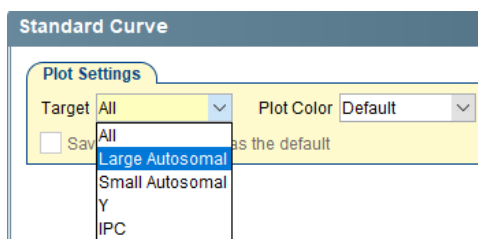


Рисунок 77

- Убедиться, что параметры каждой калибровочной кривой соответствуют значениям:

- коэффициент корреляции R^2 не ниже 0,99;
- наклон калибровочной кривой Slope от -3,3 до -3,6.

ВАЖНО! Если параметры калибровочной кривой не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными St. Если параметры калибровочной кривой снова не будут соответствовать требуемым значениям, приготовить новые калибраторы и провести ПЦР-РВ. **Использовать для количественного анализа калибровочную кривую с параметрами, не соответствующими требуемым критериям, запрещено.**

- В таблице результатов «View Well Table» выбрать пункт «Group By» и выбрать «Well Position (Column)» для расположения последовательности образцов и стандартов в таблице результатов согласно колонкам планшета (рисунок 78).

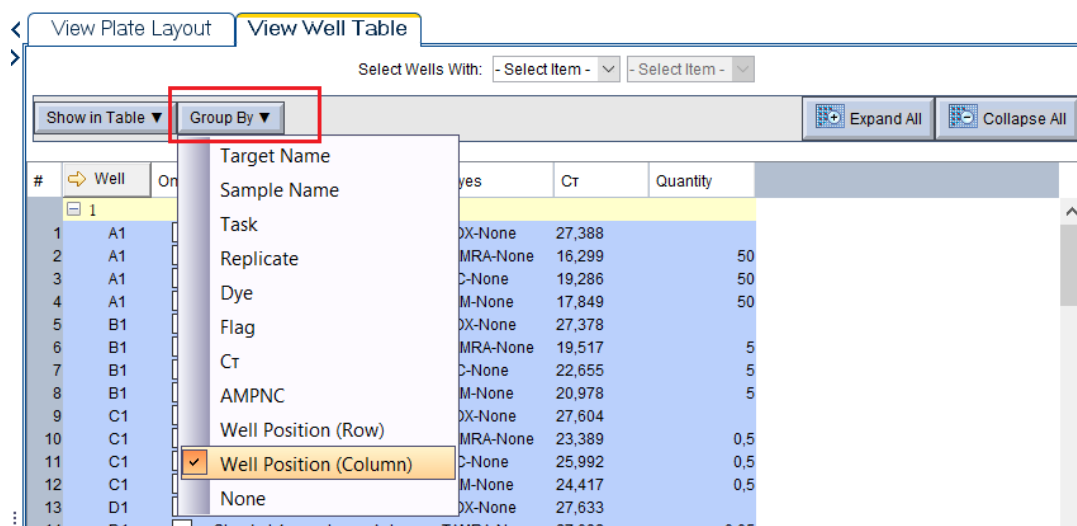


Рисунок 78

- Оценить результаты прохождения NC в соответствии с таблицей 6 раздела 9 «Интерпретация результатов».

ВАЖНО! Если результаты прохождения NC не соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными St. Повторное получение неудовлетворительных результатов для NC может свидетельствовать о контаминации реагентов.

Если параметры калибровочной кривой соответствуют указанным критериям, и результаты прохождения NC соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, перейти к п. 6.

- Оценить значения в столбце **Quantity** и **Ct** по каждой мишени (**Small autosomal, Large autosomal, Y**) для каждого исследуемого образца в соответствии с разделом 9 «Интерпретация результатов». Для оценки концентрации геномной ДНК и определения других количественных показателей в соответствии с разделом 9 «Интерпретация результатов» необходимо использовать значение **Quantity** из таблицы «View Well Table».

8.2.2. Автоматический расчет степени деградации и разведения

В случае использования программного обеспечения HID для автоматического расчета степени деградации и разведения:

- Нажать «**Export**» (рисунок 79).

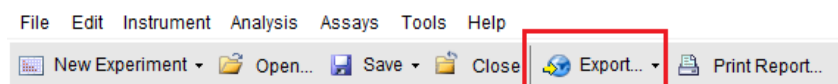


Рисунок 79

- В открывшемся окне присвоить файлу данных название и выбрать папку для экспорта (рисунок 80).

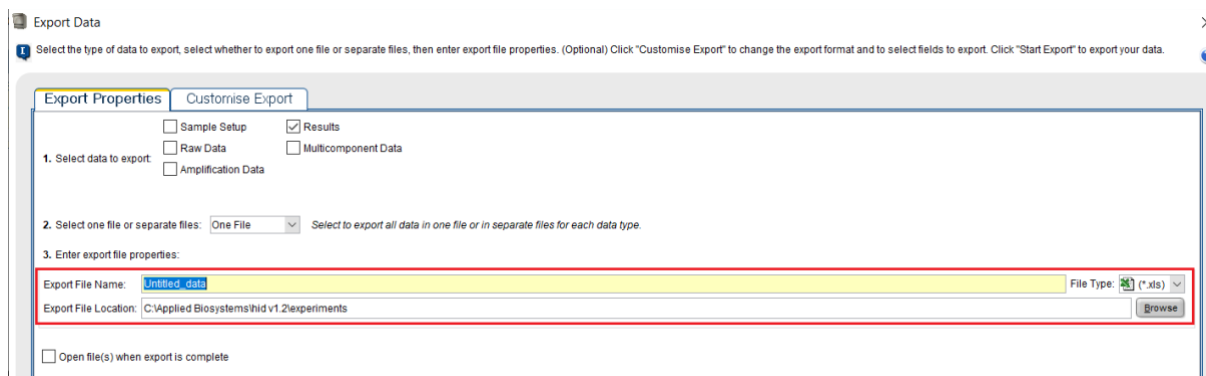


Рисунок 80

3. Перейти на вкладку «**Customise Export**». В пункте «**Select Results Content**» оставить отмеченными **только Sample Name, Target Name, Ct и Quantity** (рисунок 81). Нажать «**Start Export**».

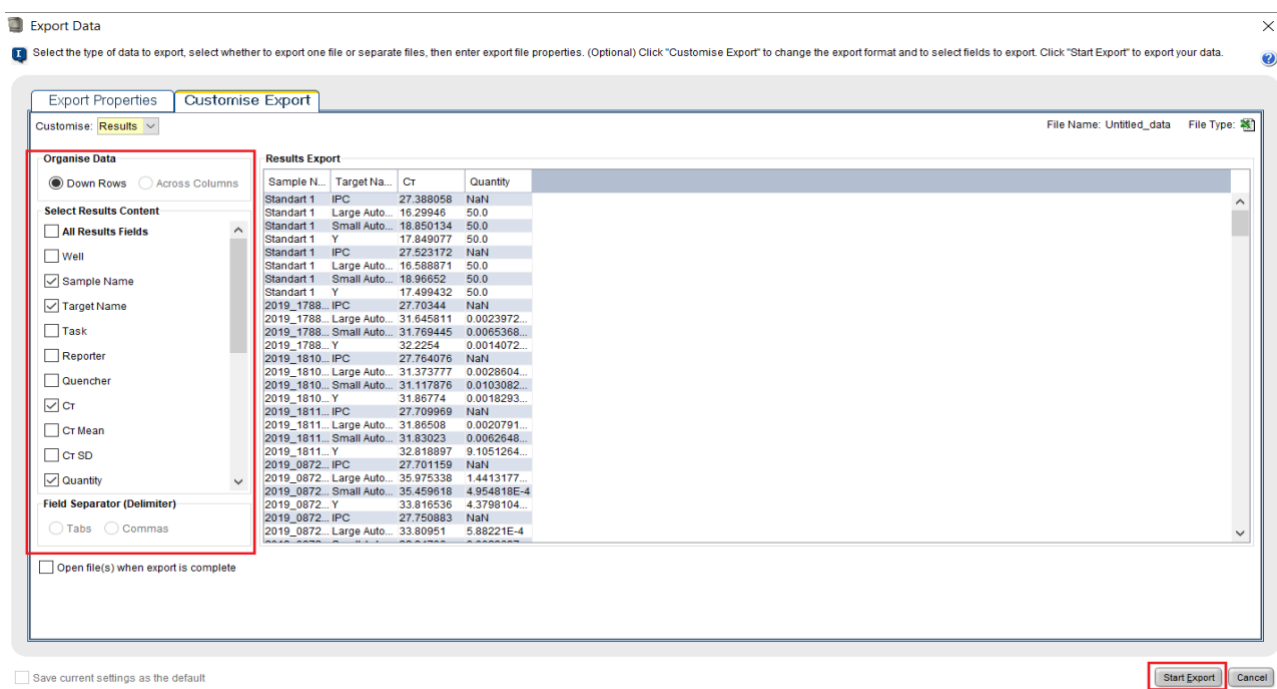


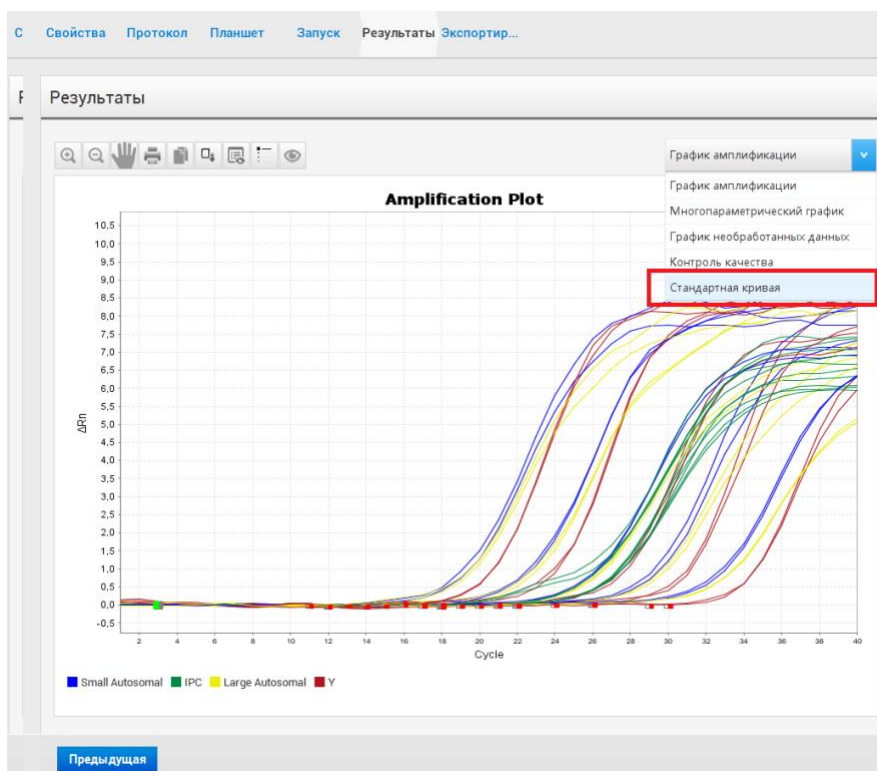
Рисунок 81

4. Открыть полученный файл Excel, выделить и копировать результаты. Открыть шаблон для расчета степени деградации и разведения образцов (предоставляет производитель набора). На листе «**Данные rQ**» выделить ячейку **A1** (отмечена желтым), нажать правую кнопку мыши и выбрать пункт «**Вставить**». Данные загрузятся в шаблон, который автоматически произведет расчет степени деградации и необходимого разведения образцов. Результаты расчета содержатся на листе «**Разведение и деградация**».

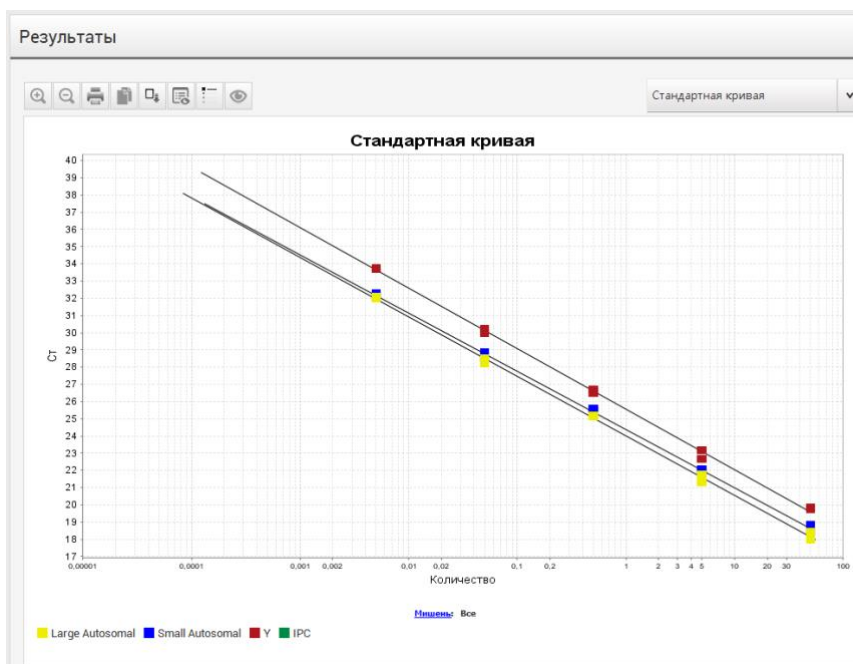
8.3. Программное обеспечение QuantStudio™ Design& Analysis Software

8.4.1. Обработка результатов

1. Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **QuantStudio™ Design& Analysis Software**.
2. Оценить **калибровочные образцы (St)** и калибровочную кривую:
 - Кликнуть по вкладке «**Результаты**», в выпадающем списке «**График амплификации**» выбрать «**Стандартная кривая**» (рисунок 82).



- Оценить параметры калибровочных кривых по каждой мишени (рисунок 83).



- Нажать на клавишу «Параметры графика», последовательно открыть калибровочную кривую для каждой мишени (рисунок 84).

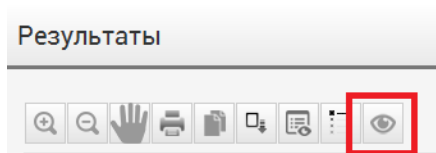


Рисунок 84

- Убедиться, что параметры каждой калибровочной кривой соответствуют значениям:

- коэффициент корреляции R^2 не ниже 0,99;
- наклон калибровочной кривой Slope от -3,3 до -3,6.

ВАЖНО! Если параметры калибровочной кривой не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными St. Если параметры калибровочной кривой снова не будут соответствовать требуемым значениям, приготовить новые калибраторы и провести ПЦР-РВ. **Использовать для количественного анализа калибровочную кривую с параметрами, не соответствующими требуемым критериям, запрещено.**

3. В меню планшета справа выбрать данные списком (рисунок 85).

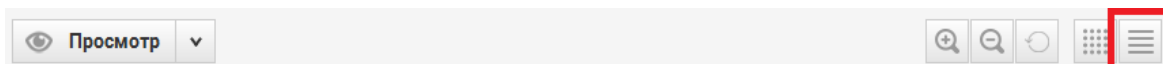


Рисунок 85

4. В таблице результатов в графе «Группировать по» выбрать пункт «Положение лунки (столбец)» для расположения последовательности образцов и стандартов в таблице результатов согласно колонкам планшета (рисунок 86).

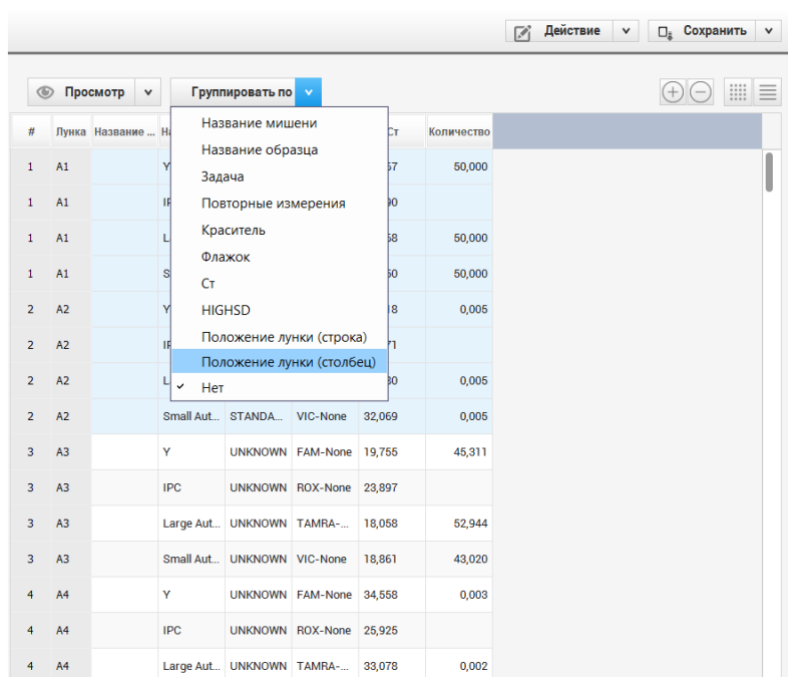


Рисунок 86

5. Оценить результаты прохождения NC в соответствии с таблицей 6 раздела 9 «Интерпретация результатов».

ВАЖНО! Если результаты прохождения NC не соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными St. Повторное получение неудовлетворительных результатов для NC может свидетельствовать о контаминации реагентов.

Если параметры калибровочной кривой соответствуют указанным критериям, и результаты прохождения NC соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, перейти к п. 6.

6. Оценить значения в столбце **Quantity** и **Ст** по каждой мишени (**Small autosomal**, **Large autosomal**, **Y**) (рисунок 87) для каждого исследуемого образца в соответствии с разделом 9 «Интерпретация результатов». Для оценки концентрации геномной ДНК

и определения других количественных показателей в соответствии с разделом 9 «Интерпретация результатов» необходимо использовать значение **Quantity** из таблицы «View Well Table».

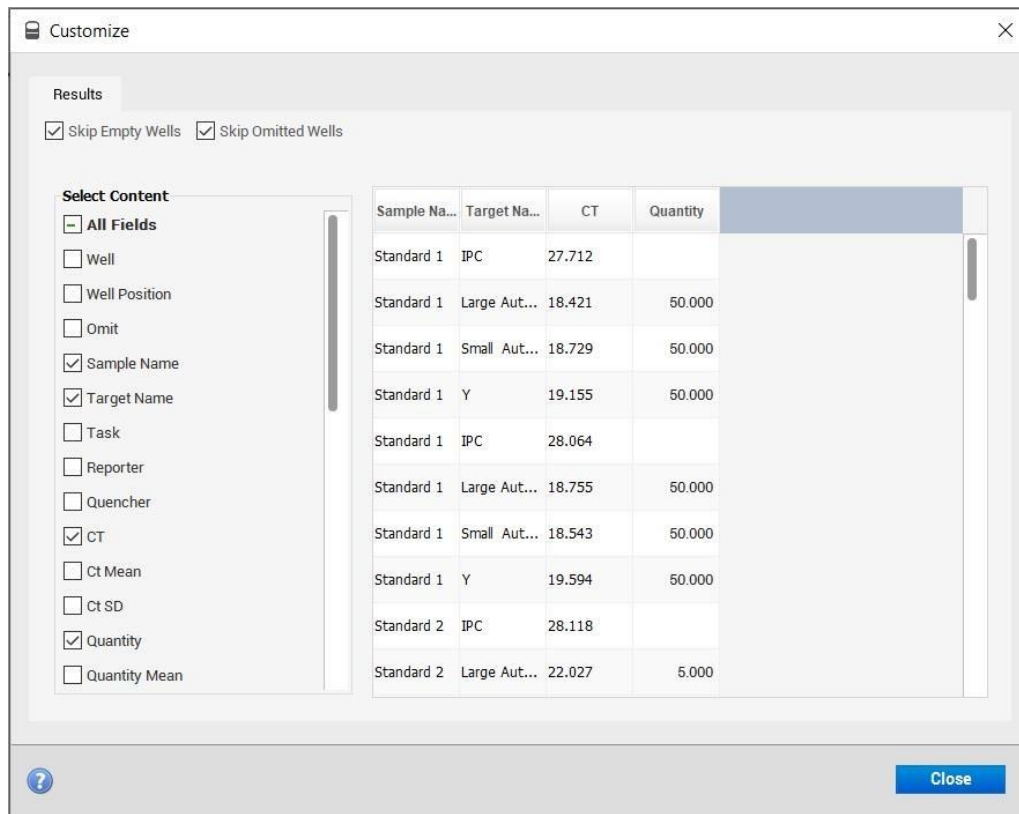


Рисунок 87

8.4.2. Автоматический расчет степени деградации и разведения

Для автоматического расчета степени деградации и разведения:

1. Нажать «**Export**» (рисунок 88).

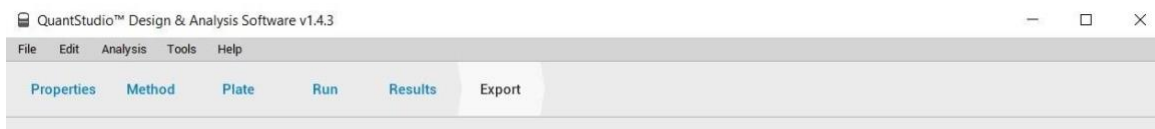


Рисунок 88

2. В открывшемся окне присвоить файлу данных название и выбрать папку для экспорта. В разделе «**Content**» оставить галочку только в графе **Results**. Нажать «**Customize**» (рисунок 89).

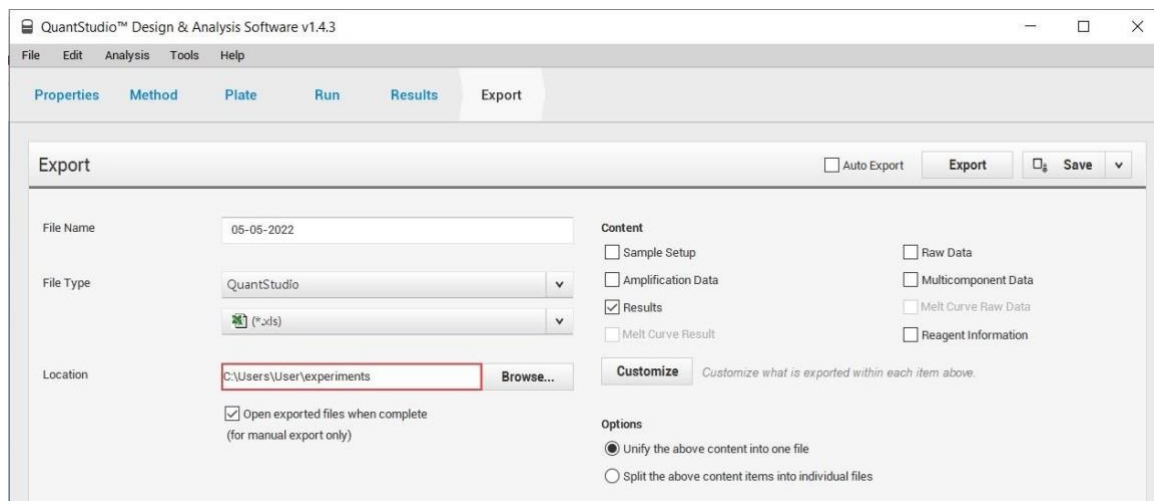


Рисунок 89

3. В открывшемся окне отметить галочками **только Sample Name, Target Name, CT и Quantity**. Также оставить отмеченными **Skip Empty Wells** и **Skip Omitted Wells**. Нажать «Close».

ВАЖНО! Важен порядок выбора ячеек для экспорта. Их следует выбирать в соответствии с порядком, указанным выше, так, чтобы в получившейся таблице **Sample Name** был в первом столбце, **Target Name** – во втором, **CT** – в третьем, а **Quantity** – в четвертом.

4. В исходном окне нажать «**Export**» (рисунок 90).

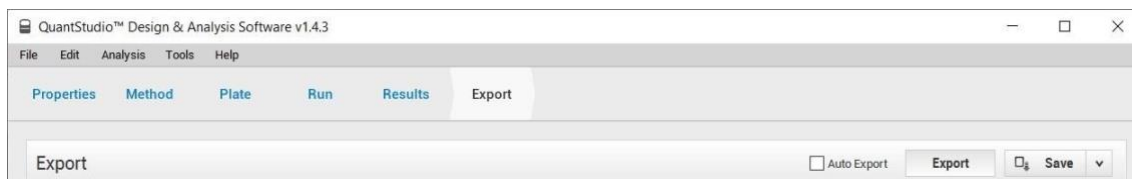


Рисунок 90

5. Открыть полученный файл Excel, выделить и копировать результаты. Открыть шаблон для расчета степени деградации и разведения образцов (предоставляет производитель набора). На листе «**Данные rQ**» выделить ячейку **A1** (отмечена желтым), нажать правую кнопку мыши и выбрать пункт «**Вставить**». Данные загрузятся в шаблон, который автоматически произведет расчет степени деградации и необходимого разведения образцов. Результаты расчета содержатся на листе «**Разведение и деградация**».

9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов анализа провести согласно таблице 6.

Таблица 6 – Интерпретация результатов

Образец	Результат ПЦР-РВ по мишеням				Интерпретация результата
	VIC	TAMRA	FAM	ROX	
	aS	aL	Y	IPC	
Результаты всего анализа не подлежат учету в любом из следующих случаев					
St	Нет кривой амплификации по любой из мишеней		Есть/нет кривой амплификации	ПЦР-РВ прошла некорректно, проблемы с реагентами или амплификатором	
NC	Нет кривой амплификации		Нет кривой амплификации	ПЦР-РВ прошла некорректно, проблемы с реагентами или амплификатором	
NC	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (C _T ≤35,0)		Есть/нет кривой амплификации	Контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ	
Результаты анализа не подлежат учету 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 ≤35,0)	Есть/нет кривой амплификации	Ложноположительный результат
Результаты анализа подлежат учету при получении следующих данных					
St	Есть кривая амплификации		Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (C _T ≤ 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 ≤35,0)		Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (C _T ≤ C _{T NC} +2)	В пробе содержится ДНК человека, ингибирование отсутствует.	
	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (C _T ≤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 ≤ C _{T NC} +2)	В пробе содержится ДНК человека женского пола.
	Деградированные образцы				

Образец	Результат ПЦР-РВ по мишени				Интерпретация результата
	VIC	TAMRA	FAM	ROX	
	aS	aL	Y	IPC	
	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (C _T ≤35,0)	Нет кривой амплификации/ Есть кривая амплификации, которая отстает от кривой амплификации мишени Small Autosomal более чем на 1 цикл	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (C _T ≤35,0)	Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (C _T ≤ C _T NC+2)	В пробе содержится ДНК человека мужского пола.
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (C _T ≤35,0)	Нет кривой амплификации/ Есть кривая амплификации после 35 цикла (C _T >35,0)		В пробе содержится ДНК человека женского пола.		
Образцы с ингибиторами ПЦР					
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (C _T ≤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 (C _T ≤35,0)		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	В пробе содержится ДНК человека женского пола, ингибирование ПЦР-РВ.	
Образцы без ДНК человека					
Нет кривой амплификации/ Есть кривая амплификации после 35 цикла (C _T >35,0)			Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (C _T ≤ C _T NC+2)	В пробе отсутствует ДНК человека.	
Обозначения: St – калибровочный образец, NC – отрицательный контрольный образец ПЦР, Unknown – исследуемый образец.					

9.2. Оценка результатов анализа

Концентрация геномной ДНК в образце определяется по короткому фрагменту аутосомной ДНК – значение концентрации мишени aS (нг/мкл), рассчитанное в программном обеспечении прибора для ПЦР-РВ.

Расчет степени деградации ДНК в образце осуществляется по формуле:

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

, где

концентрации мишеней aS (нг/мкл) – значения концентрации мишени Small autosomal, рассчитанные в программном обеспечении прибора для ПЦР-РВ.

концентрации мишеней aL (нг/мкл) – значения концентрации мишени Large autosomal, рассчитанные в программном обеспечении прибора для ПЦР-РВ.

Половая принадлежность определяется наличием или отсутствием амплификации фрагмента Y-хромосомы. Проанализировать значения C_T для мишени Y. Наличие значений

$C_t \leq 35,0$ говорит о присутствии мужской ДНК в образце, отсутствие сигнала или $C_t > 35,0$ 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 , рассчитанная в программном обеспечении прибора для ПЦР-РВ,

aS (нг/мкл) – концентрация мишени Small autosomal, рассчитанная в программном обеспечении прибора для ПЦР-РВ.

Оценка ингибирования определяется значением C_t внутреннего положительного контроля (IPC). Значения C_t для IPC в исследуемых образцах не должны превышать значения C_t для IPC в отрицательном контроле (NC) более чем на 2 цикла: $C_t \leq C_{t \text{ NC}} + 2$. Получение значений, превышающих значение C_t для IPC в NC более чем на 2 цикла ($C_t > C_{t \text{ NC}} + 2$), 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 $C_t > C_{t \text{ NC}} + 2$, 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.

10. ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

Компоненты набора реагентов (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию необходимо утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

ВАЖНО! При удалении пробирок, содержащих продукты амплификации, недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять производителю ООО «НПФ Синтол» по адресу: 127550, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 42, тел. (495) 984-69-93, e-mail: syntol@syntol.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Значение
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Температурный диапазон
	Не допускать воздействия солнечного света
	Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Использовать до
	Номер по каталогу
	Код партии