

**Набор реагентов для идентификации личности
по 31-му STR-локусу «Human ID»**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



СОДЕРЖАНИЕ

1.	НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
1.1.	Назначение набора.....	3
1.2.	Количество анализируемых образцов.....	3
1.3.	Область применения.....	3
1.4.	Потенциальные пользователи.....	3
1.5.	Принцип метода, положенный в основу работы набора.....	3
2.	ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	5
2.1.	Состав набора.....	5
2.2.	Функциональные характеристики.....	5
3.	УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА.....	5
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	5
5.	ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА.....	6
6.	ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ.....	8
6.1.	Проведение реакции амплификации в случае исследования очищенной ДНК.....	8
6.2.	Проведение прямой амплификации образца, собранного на зонд-тампоне и обработанного реагентом для ускоренного выделения ДНК.....	9
6.3.	Проведение прямой амплификации панча FTA-карты.....	11
7.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.....	12
7.1.	Проведение капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе «НАНОФОР 05».....	12
7.2.	Проведение капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer/3500xL Genetic Analyzer.....	16
8.	АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	20
8.1.	Анализ данных в программе GeneMarker.....	20
8.2.	Анализ данных в программе GeneMapper.....	26
9.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	28
10.	ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	29
11.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	29
12.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	29

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Назначение набора

Набор реагентов «Human ID» предназначен для генетической идентификации и определения родства человека по тридцати одному STR-локусу:

- 26-ти аутосомным локусам (D3S1358, D2S441, D1S1656, D19S433, TPOX, D2S1338, TH01, D16S539, CSF1PO, D18S51, D21S11, D6S1043, D22S1045, D8S1179, vWA, D5S818, FGA, D13S317, D7S820, D12S391, D10S1248, SE33, D8S1132, D7S1517, Penta D, Penta E);
- 5-ти половым локусам (Amelogenin, Yindel, SRY, DYS391, DYS392).

Набор предназначен для исследования образцов очищенной ДНК. Набор позволяет также проводить прямую амплификацию ДНК при использовании образца биоматериала на FTA-карте (например, «БиоКарта», ООО «НПФ Синтол») или образца биоматериала, собранного на зонде-тампоне и обработанного реагентом для ускоренного выделения ДНК (например, реагент «ГенПреп», ООО «НПФ Синтол»).

1.2. Количество анализируемых образцов

Набор рассчитан на проведение:

- 200 реакций, включая контрольные образцы, при объеме реакции 25 мкл;
- 400 реакций, включая контрольные образцы, при объеме реакции 12,5 мкл;
- 500 реакций, включая контрольные образцы, при объеме реакции 10 мкл.

Примечание – При проведении исследования в объеме реакции 10 мкл необходимо приобрести дополнительную пробирку с реагентом СД-520 (кат. № СД-520, ООО «НПФ Синтол»).

1.3. Область применения

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

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 мультиплексная амплификация тридцати одного STR-локуса с последующим разделением ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза.

Представленные в наборе STR-локусы высоко полиморфны, что позволяет достоверно идентифицировать личность. В набор входят все локусы баз данных CODIS (Combined DNA Index System) и ESS (European Standard Set), а также локусы SE33, Penta D, Penta E.

Используемые в наборе праймеры мечены флуоресцентными красителями, детектируемыми по каналам Blue, Green, Yellow, Red, Purple. Стандарт длин СД-520, входящий в состав набора реагентов, детектируется по каналу Orange. Использование шести красителей позволяет одновременно детектировать продукты ПЦР и стандарт длин в одном капилляре.

В таблице 1 приведены характеристики STR-локусов, выявляемых с помощью набора реагентов «Human ID».

Таблица 1 – Характеристики STR-локусов, определяемых с помощью набора «Human ID»

Канал детекции	Локус	Хромосомная локализация	Диапазон аллелей	Аллельное состояние ПКО
Blue	Amelogenin	Xp22.1-22.3	X	X
		Yp11.2	Y	Y
	D3S1358	3p21.31	8-21	15, 17
	D2S441	2p14	8-17	10, 11
	D1S1656	1q42	8-21	18.3, 19.3
	D19S433	19q12	5.2-20	13, 15
	TPOX	2p25.3	4-16	8, 12
	D2S1338	2q35	10-29	17, 26
Green	TH01	11p15.5	3-14	6, 9.3
	D16S539	16q24.1	4-16	12
	CSF1PO	5q33.1	5-16	10, 12
	D18S51	18q21.33	6-28.3	15, 16
	D21S11	21q21.1	12-41.2	30, 32.2
	D6S1043	6q15	10-25	11, 20
Yellow	Yindel (rs2032678)	Yq11.221	1-2	2
	D22S1045	22q12.3	7-20	14, 15
	D8S1179	8q24.13	4-20	13
	vWA	12p13.31	10-25	17, 18
	D5S818	5q23.2	6-19	10, 12
	FGA	4q31.3	12.2-51.2	19, 24
Red	SRY	Yp11.2	SRY	SRY
	D13S317	13q31.1	5-17	11
	D7S820	7q21.11	5-16	8, 12
	D12S391	12p13.2	13-28	18.3, 20
	D10S1248	10q26.3	7-21	13, 14
	SE33	6q14	3-43	25.2, 27.2
Purple	DYS391	Yq11.21	6-14	11
	D8S1132	8q	12.1-27	18, 22
	D7S1517	7q31.2	16-28	22, 25
	Penta D	21q22.3	2.2-17	9
	Penta E	15q26.2	5-25	5, 14
	DYS392	Yq11.223	3-21	14

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации 31-го STR-локуса в одной пробирке. Размер амплифицируемых ПЦР продуктов находится в диапазоне от 65 до 490 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Наличие 12-ти mini-STR локусов позволяет получить более полный профиль у деградированных образцов. Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов (например, «НАНОФОР 05», ИАП РАН).

Для получения полного генотипа (по 31-му STR-локусу) исследуемого образца достаточно 0,0625 нанограмм (нг) недеградированной ДНК. Оптимальное количество недеградированной ДНК, вносимой в реакцию, составляет 1 нг для объема реакции 25 мкл, 0,5 нг для объема реакции 12,5 мкл и 10 мкл. Диапазон концентраций ДНК для получения достоверных результатов исследования с помощью набора составляет от 0,0625 до 2 нг в реакции.

Максимальный объем вносимого в реакцию раствора очищенной ДНК составляет 15 мкл¹ для объема реакции 25 мкл, 7,5 мкл для объема реакции 12,5 мкл и 6 мкл для объема реакции 10 мкл.

¹ В случае исследования низкотитражных образцов допускается внесение в реакцию до 17,5 мкл образца.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав набора

Таблица 2 – Состав набора

№	Компонент	Описание	Номинальный объем, мл	Количество
1.	РБ	Реакционный буфер для ПЦР	1,6	1 пробирка
2.	СП	Смесь специфических праймеров	0,4	1 пробирка
3.	ПКО НID	Положительный контрольный образец, содержащий синтетические фрагменты различной длины аутосомной ДНК и Y-хромосомы человека в концентрации 0,5 нг/мкл	0,075	1 пробирка
4.	СД-520	Стандарт длин (60, 70, 80, 100, 140, 180, 220, 240, 260, 300, 340, 380, 420, 460, 480, 500, 520)	0,4	1 пробирка
5.	АЛ	Аллельная лестница	0,025	1 пробирка
6.	dd H ₂ O	Деионизированная вода	1,7	1 пробирка

2.2. Функциональные характеристики

Количество недеградированной ДНК человека для получения полного генотипа (STR-профиля) составляет 0,0625 нг/реакция.

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 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 (например, ДТклассик (ООО «НПО ДНК-технология»));
- автоматический генетический анализатор (например, «НАНОФОР 05» (ИАП РАН), 3500 Genetic Analyzer, 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems));
- центрифуга для микропробирок объемом 0,2 мл или 96-луночных ПЦР-планшетов;
- микроцентрифуга-вортекс для пробирок объемом 1,5 или 2,0 мл;
- штатив для 96-луночных 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-96x1,5/2,0», кат. № СТ-17);
- набор дозаторов пипеточных переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл;
- холодильник 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;
- 96-луночные ПЦР-планшеты или микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл в стрипах, не содержащие ДНКаз;
- пленка для ПЦР-планшетов или крышки к микропробиркам в стрипах;
- антииспаритель (септа) для 96-луночного планшета, совместимый с генетическим анализатором (например, «Антииспаритель (септа) для 96-луночного планшета Нанофор 05», ООО «НПФ Синтол»);

- пробирки, не содержащие ДНКазы, объемом 1,5 или 2,0 мл;
- реагент для проведения прямой амплификации панча FTA-карт «GP Card» (ООО «НПФ Синтол»);
- спектральный калибратор «Spectrum 6A» (ООО «НПФ Синтол»);
- полимер для проведения капиллярного электрофореза (например, «ПДМА-6», ООО «НПФ Синтол»);
- буфер для проведения капиллярного электрофореза (например, ТАПС);
- высокоочищенный деионизованный формамид для электрокинетической инъекции (Di-Fa или Hi-Di);
- емкость для сброса использованных материалов.

6. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

6.1. Проведение реакции амплификации в случае исследования очищенной ДНК

6.1.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

1. Для приготовления рабочей реакционной смеси (РС) рассчитать требуемые количества реагентов *РБ*, *СП* и *dd H₂O* согласно таблице 4, исходя из количества исследуемых и контрольных образцов.

Таблица 4 – Расход реагентов при приготовлении рабочей РС в случае исследования очищенной ДНК

Реагент/ образец	Расход реагента/образца, мкл		
	на 1 реакцию объемом 25 мкл	на 1 реакцию объемом 12,5 мкл	на 1 реакцию объемом 10 мкл
РБ	8	4	3,2
СП	2	1	0,8
ДНК	от 2 до 15*	от 2 до 7,5	от 2 до 6
dd H ₂ O	до объема 25	до объема 12,5	до объема 10

* В случае исследования низкотитражных образцов допускается внесение в реакцию до 17,5 мкл образца.

ВАЖНО! Оптимальным количеством ДНК, вносимым в реакцию, является 1 нг для объема реакции 25 мкл и 0,5 нг для объема реакции 12,5 и 10 мкл.

ВАЖНО! С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контрольный образец (ПКО) и один отрицательный контрольный образец (ОКО). В качестве ОКО используется деионизированная вода (*dd H₂O*), в качестве ПКО – *ПКО HID*.

ВАЖНО! Необходимо включить в расчет приготовления рабочей РС дополнительную реакцию для компенсации погрешности пипетирования.

2. Разморозить пробирки с *РБ*, *СП*, *ПКО HID*, *dd H₂O*, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.

Примечание – После размораживания допускается хранение реагентов при температуре от 2 °С до 8 °С в течение месяца. Допускается повторное замораживание реагентов (до 10 циклов замораживания–оттаивания).

3. Смешать согласно таблице 4 необходимый объем *РБ*, *СП* и *dd H₂O* в чистой пробирке объемом 1,5 или 2,0 мл (в зависимости от конечного объема приготовления), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать.
4. Внести в лунку планшета или стрипа приготовленную РС в необходимом объеме согласно таблице 4.
5. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести на стенку лунки планшета или стрипа с приготовленной РС исследуемый образец в объеме согласно таблице 4.
6. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в одну лунку планшета или стрипа с приготовленной РС 2 мкл *dd H₂O* (отрицательный контрольный образец ОКО), в другую лунку:
 - для 25 мкл реакции – 2 мкл *ПКО HID*,
 - для 12,5 мкл реакции – 1 мкл *ПКО HID*,
 - для 10 мкл реакции – 1 мкл *ПКО HID*.
7. Закрыть лунки планшета или стрипа.

8. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. 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.

6.1.2. Проведение реакции амплификации

1. Поместить планшеты или стрипы в прибор для ПЦР. Убедиться, что лунки планшетов или стрипов плотно закрыты.
2. Запустить программу амплификации согласно таблице 5.

Таблица 5 – Программа амплификации

Температура	Время	Количество циклов
95 °C	2 мин	1
95 °C	5 с	30 циклов
61 °C	80 с	
60 °C	10 мин	1
4 °C	∞	–

Примечание – При использовании амплификатора GeneAmp PCR System 9700 необходимо использовать mode 9600.

3. После окончания программы амплификации вынуть планшеты и пробирки из амплификатора. ПЦР-продукты можно хранить неделю в защищенном от света месте при температуре от 2 °C до 8 °C или длительно при температуре минус 20 °C.

6.2. Проведение прямой амплификации образца, собранного на зонд-тампоне и обработанного реагентом для ускоренного выделения ДНК

Возможно проведение прямой амплификации образца биоматериала, собранного на зонд-тампоне и обработанного реагентом для ускоренного выделения ДНК (например, реагент «ГенПреп», ООО «НПФ Синтол»).

6.2.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

1. Для приготовления рабочей реакционной смеси (РС) рассчитать требуемые количества реагентов РБ, СП и dd H₂O согласно таблице 6, исходя из количества исследуемых и контрольных образцов.

Таблица 6 – Расход реагентов при приготовлении рабочей РС в случае прямой амплификации лизата исследуемого образца

Реагент/образец	Расход реагента/образца, мкл		
	на 1 реакцию объемом 25 мкл	на 1 реакцию объемом 12,5 мкл	на 1 реакцию объемом 10 мкл
РБ	8	4	3,2
СП	2	1	0,8
Лизат исследуемого образца	3	3	3
dd H ₂ O	12	4,5	3

ВАЖНО! С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контрольный образец (ПКО) и один отрицательный контрольный образец (ОКО). В качестве ОКО используется деионизированная вода (dd H₂O), в качестве ПКО – ПКО НID.

ВАЖНО! Необходимо включить в расчет приготовления рабочей РС дополнительную реакцию для компенсации погрешности пипетирования.

- Разморозить пробирки с *РБ*, *СП*, *ПКО НID*, *dd H₂O*, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.

Примечание – После размораживания допускается хранение реагентов при температуре от 2 °С до 8 °С в течение месяца. Допускается повторное замораживание реагентов (до 10 циклов замораживания–оттаивания).

- Смешать согласно таблице 6 необходимый объем *РБ*, *СП* и *dd H₂O* в чистой пробирке объемом 1,5 или 2 мл (в зависимости от конечного объема приготовления), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать.
- Внести в лунку планшета или стрипа приготовленную РС в объеме 22 мкл (для объема реакции 25 мкл)/ 9,5 мкл (для объема реакции 12,5 мкл)/ 7 мкл (для объема реакции 10 мкл).
- Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести на стенку лунки планшета или стрипа с приготовленной РС 3 мкл исследуемого образца (лизата исследуемого образца).
- Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в одну лунку планшета или стрипа с приготовленной РС 2 мкл *dd H₂O* (отрицательный контрольный образец ОКО), в другую лунку:
 - для 25 мкл реакции – 15 мкл *ПКО НID*,
 - для 12,5 мкл реакции – 7,5 мкл *ПКО НID*,
 - для 10 мкл реакции – 4 мкл *ПКО НID*.
- Закрыть лунки планшета или стрипа.
- Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. 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.

6.2.2. Проведение реакции амплификации

- Поместить планшеты или стрипы в прибор для ПЦР. Убедиться, что лунки планшетов или стрипов плотно закрыты.
- Запустить программу амплификации согласно таблице 7.

Таблица 7 – Программа амплификации

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	2 мин	1
95 °С	5 с	26-27 циклов
61 °С	70 с	
60 °С	20 мин	1
4 °С	∞	–

Примечание – При использовании амплификатора GeneAmp PCR System 9700 необходимо использовать mode 9600.

- После окончания программы амплификации вынуть планшеты и пробирки из амплификатора. ПЦР-продукты можно хранить неделю в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С или длительно при температуре минус 20 °С.

6.3. Проведение прямой амплификации панча ФТА-карты

Возможно проведение прямой амплификации панча ФТА-карты с нанесенным на нее биологическим образцом диаметром 1–1,2 мм.

ВАЖНО! Для проведения прямой амплификации панча ФТА-карты, помимо реагентов, входящих в состав набора «Human ID», необходимо использовать реагент «Gr Card» (кат. № HG-702, ООО «НПФ Синтол»).

6.3.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

1. Для приготовления рабочей реакционной смеси (РС) рассчитать требуемые количества реагентов *РБ*, *СП*, *Gr Card* и *dd H₂O* согласно таблице 8, исходя из количества исследуемых и контрольных образцов.

Таблица 8 – Расход реагентов при приготовлении рабочей РС в случае прямой амплификации панча ФТА-карты

Реагент/образец	Расход реагента/образца	
	на 1 реакцию объемом 25 мкл	на 1 реакцию объемом 12,5 мкл
РБ	8 мкл	4 мкл
СП	2 мкл	1 мкл
Панч	1 шт.	1 шт.
Gr Card	5 мкл	5 мкл
dd H ₂ O	10 мкл	2,5 мкл

ВАЖНО! С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контрольный образец (ПКО) и один отрицательный контрольный образец (ОКО). В качестве ОКО используется деионизированная вода (*dd H₂O*), в качестве ПКО – *ПКО HID*.

ВАЖНО! Необходимо включить в расчет приготовления рабочей РС дополнительную реакцию для компенсации погрешности пипетирования.

2. Разморозить пробирки с *РБ*, *СП*, *ПКО HID*, *dd H₂O*, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.

Примечание – После размораживания допускается хранение реагентов при температуре от 2 °С до 8 °С в течение месяца. Допускается повторное замораживание реагентов (до 10 циклов замораживания–оттаивания).

3. Смешать согласно таблице 8 необходимый объем *РБ*, *СП*, *Gr Card* и *dd H₂O* в чистой пробирке объемом 1,5 или 2 мл (в зависимости от конечного объема приготовления), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать.
4. Внести в лунку планшета или стрипа приготовленную РС в объеме 25 мкл или 12,5 мкл (согласно таблице 8).
5. Внести в лунку планшета или стрипа с приготовленной РС панч ФТА-карты.
6. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в одну лунку планшета или стрипа с приготовленной РС 2 мкл *dd H₂O* (отрицательный контрольный образец ОКО), в другую лунку:
 - для 25 мкл реакции – 15 мкл *ПКО HID*,
 - для 12,5 мкл реакции – 7,5 мкл *ПКО HID*.
7. Закрыть лунки планшета или стрипа.
8. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в микропробирках.

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

6.3.2. Проведение реакции амплификации

1. Поместить планшеты или стрипы в прибор для ПЦР. Убедиться, что лунки планшетов или стрипов плотно закрыты.
2. Запустить программу амплификации согласно таблице 9.

Таблица 9 – Программа амплификации

Температура	Время	Количество циклов
95 °C	2 мин	1
95 °C	5 с	26-27 циклов
61 °C	70 с	
60 °C	20 мин	1
4 °C	∞	–

Примечание – При использовании амплификатора GeneAmp PCR System 9700 необходимо использовать mode 9600.

3. После окончания программы амплификации вынуть планшеты и пробирки из амплификатора. ПЦР-продукты можно хранить неделю в защищенном от света месте при температуре от 2 °C до 8 °C или длительно при температуре минус 20 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Для получения полного STR-профиля проводится фрагментный анализ – электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «Human ID».

7.1. Проведение капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе «НАНОФОР 05»

ВАЖНО! Получение корректных результатов возможно только при использовании специализированного деионизованного формамида для электрокинетической инъекции образцов высокой степени очистки (Di-Fa или Hi-Di).

7.1.1 Проведение спектральной калибровки

ВАЖНО! Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с шестичетным калибратором «Spectrum 6A» (кат. № HG-705, ООО «НПФ Синтол»).

7.1.1.1. Создание набора красителей

1. Открыть управляющую программу «Нанофор 05».
2. Открыть раздел меню «Вид», выбрать в нем «Наборы красителей» (рисунок 1).

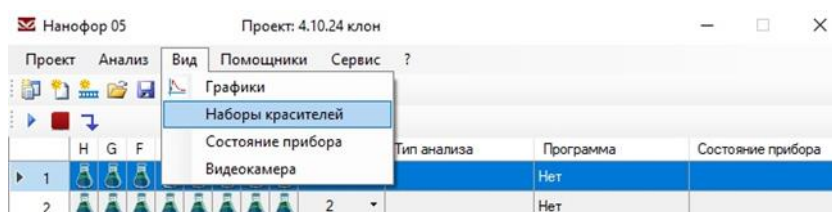


Рисунок 1

3. В открывшемся окне нажать на иконку «Создать набор» (рисунок 2).

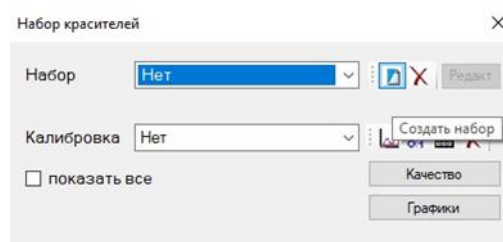


Рисунок 2

- В открывшемся окне в поле «Шаблон» выбрать **HGT-J6**, в поле «Имя набора» записать «**Spectrum 6A**» (рисунок 3). Нажать кнопку «Сохранить».

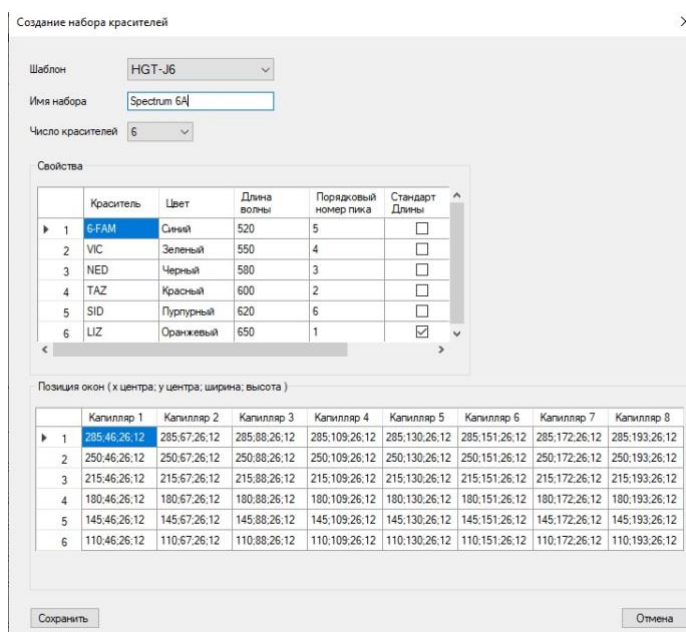


Рисунок 3

7.1.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

- В отдельной пробирке смешать **формамид** (Di-Fa или Hi-Di) и раствор «**Spectrum 6A**» в соотношении согласно таблице 10.

Таблица 10 – Расход реагентов формамид и «Spectrum 6A»

Компонент	Объем, мкл
Формамид (Di-Fa или Hi-Di)	80
Spectrum 6A	8

- Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
- Добавить **10 мкл** приготовленного раствора в лунки 96-луночного планшета.

7.1.1.3. Запуск спектральной калибровки

- Открыть раздел меню «Сервис», выбрать в нем «Спектральная калибровка» (рисунок 4).

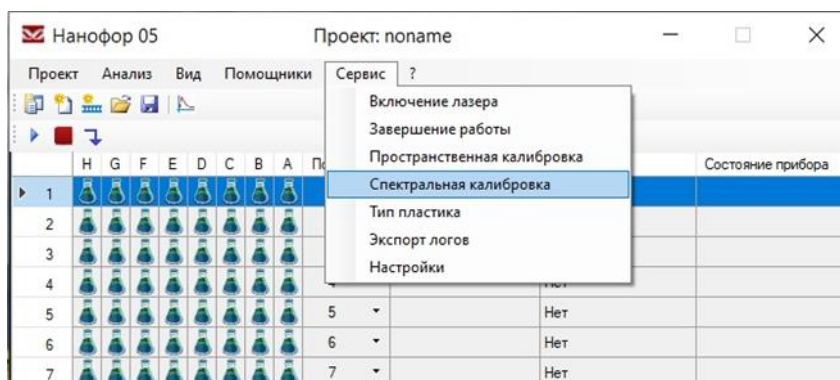


Рисунок 4

2. Выбрать ряд 96-луночного планшета, в котором находится спектральный калибратор, нажать «Далее» (рисунок 5).

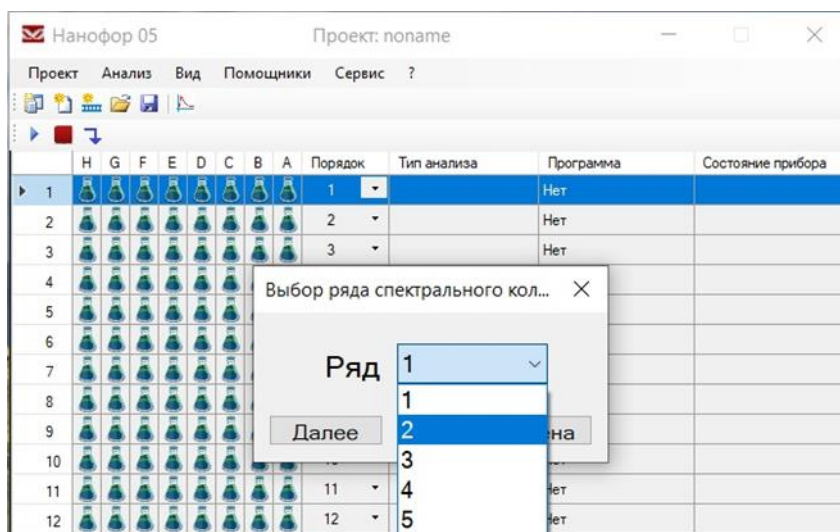


Рисунок 5

3. В качестве модуля управления выбрать «HGT_J6_Spectr_PDMA6_36», подходящий к сочетанию капиллярной сборки и типа полимера. В качестве набора красителей выбрать «Spectrum 6A» (рисунок 6).

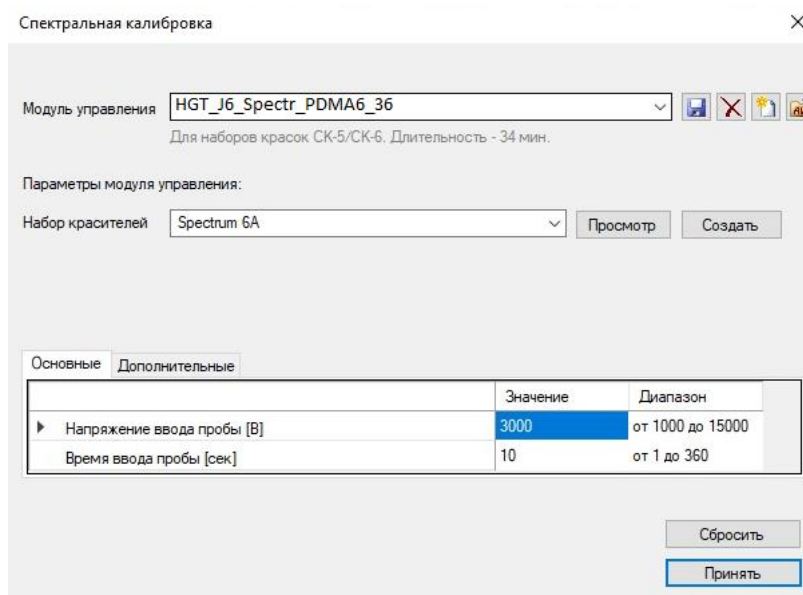


Рисунок 6

4. Кликнуть по кнопке «**Принять**». В основном окне рабочей программы нажать «**Запустить**» для начала калибровки.

7.1.2 Подготовка продуктов амплификации

1. В отдельной пробирке смешать **формамид** (Di-Fa или Hi-Di) и стандарт длин **СД-520** в соотношении согласно таблице 11.

Таблица 11 – Расход реагентов формамид и СД-520

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Формамид (Di-Fa или Hi-Di)	10
СД-520	1

ВАЖНО! При проведении исследования в объеме реакции 10 мкл необходимо приобрести дополнительную пробирку с реагентом СД-520 (кат. № СД-520, ООО «НФП Синтол»).

Примечание – При расчете объемов компонентов смеси, необходимых для всего анализа, следует учесть, что как минимум одна лунка планшета/стрипа при анализе каждой серии образцов должна содержать аллельную лестницу.

2. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить **10 мкл** смеси в каждую лунку планшета/стрипа.
4. Внести в лунки со смесью по **1 мкл** ПЦР-продукта.
5. В отдельную лунку внести **1 мкл** раствора аллельной лестницы (реагент АЛ).
6. Закрыть планшет/стрип антииспарителем (септой).
7. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
8. Денатурировать образцы в амплификаторе 1 мин при температуре 95 °С, охладить до 4 °С.

ВАЖНО! Нанесение образцов происходит из восьми лунок ряда одновременно. Не допускается запуск прибора, если в анализируемом ряду имеется хотя бы одна незаполненная лунка. В пустые лунки, не содержащие образцы, следует внести 10 мкл формамида.

9. Поместить планшет/стрип в держатель планшета и установить его в генетический анализатор в соответствии с руководством пользователя.

7.1.3 Запуск фрагментарного анализа

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе «НАНОФОР 05» проводится в соответствии с руководством пользователя, предоставляемым производителем.

Рекомендуемые параметры электрофореза для комбинации капилляров длиной 36 см и типа полимера ПДМА-6 представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Рекомендуемые значения параметров электрофореза для генетического анализатора «НАНОФОР 05»

Параметр	Рекомендуемое значение
Напряжение ввода пробы, В	1200
Время ввода пробы, с	15
Напряжение электрофореза, В	15000
Время электрофореза, с	2100
Время исключения регистрации электрофореза, с	100

Примечание – Время электрофореза и время исключения регистрации электрофореза зависят от типа полимера и длины капилляров и настраиваются пользователем в зависимости от используемой комбинации капилляров и полимера.

7.2. Проведение капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer/3500xL Genetic Analyzer

ВАЖНО! Получение корректных результатов возможно только при использовании специализированного деионизованного формамида для электрокинетической инъекции образцов высокой степени очистки (Di-Fa или Hi-Di).

7.2.1. Проведение спектральной калибровки

ВАЖНО! Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с шестичетным калибратором «Spectrum 6A» (кат. № HG-705, ООО «НПФ Синтол»).

7.2.1.1. Создание DyeSets

1. Открыть программу **Data Collection Software**.
2. Кликнуть по иконке «**Library**» в левом верхнем углу окна (рисунок 7).

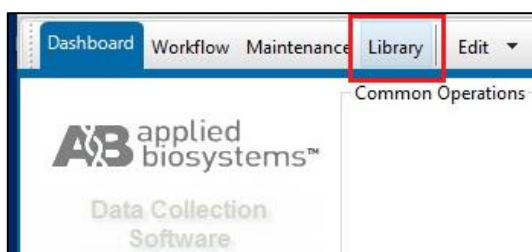


Рисунок 7

3. В разделе «**Analyze**» выбрать вкладку «**Dye Sets**» (рисунок 8).

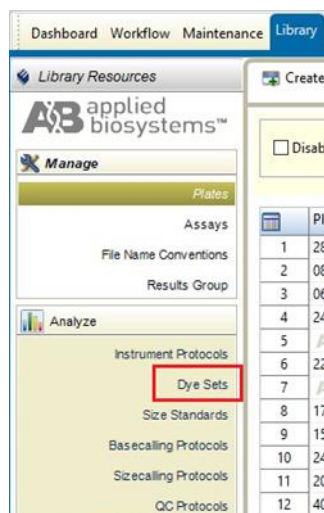


Рисунок 8

4. В верхней части нажать кнопку «**Create**» (рисунок 9).

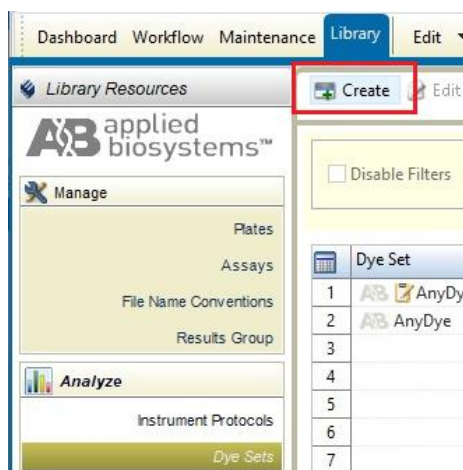


Рисунок 9

- В открывшемся окне в поле «Dye Set Name» написать «Spectrum 6A», в поле «Chemistry» из выпадающего списка выбрать «Matrix Standard», а в поле «Dye Set Template» из выпадающего списка выбрать «J6 Template» (рисунок 10).
- На вкладке «Parameters» в разделе «Matrix Condition Number Upper Limit» установить значение – 11.0 (рисунок 10).

Setup a Dye Set

* Dye Set Name: Spectrum 6A

* Chemistry: Matrix Standard

* Dye Set Template: J6 Template

Arrange Dyes

Dye Selection	Reduced Selection	Calibration Peak Order
☒	☒	6
☒	☒	4
☒	☒	3
☒	☒	2
☒	☒	1
☒	☒	5

Parameters

The parameters will be used for instruments configured with 36cm capillary array and polymer POP4

Matrix Condition Number Upper Limit: 11.0

Locate Start Point: * After Scan 400 * Before Scan 5000

* Limit Scans To: 2750

Sensitivity: 0.4

* Minimum Quality Score: 0.95

Notes: Applied Biosystems

Close Save

Рисунок 10

- Нажать кнопку «Save» для сохранения Dye Set «Spectrum 6A».

7.2.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

- В отдельной пробирке смешать **формамид** (Di-Fa или Hi-Di) и раствор «Spectrum 6A» в соотношении согласно таблице 13.

Таблица 13 – Расход реагентов формамид и «Spectrum 6A»

Компонент	Объем, мкл	
	3500 Genetic Analyzer	3500xL Genetic Analyzer
Формамид (Di-Fa или Hi-Di)	80	240
Spectrum 6A	8	24

2. Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить **10 мкл** приготовленного раствора в лунки 96-луночного планшета/стрипованных пробирок.

Примечания

- 1) В случае использования 24-капиллярного генетического анализатора внести раствор в три ряда 96-луночного планшета (возможно внесение в 1–3, 4–6, 7–9, 10–12 ряды планшета) или стрипованных пробирок.
- 2) В случае использования 16-капиллярного генетического анализатора внести раствор в два ряда 96-луночного планшета (возможно внесение в 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12 ряды планшета) или стрипованных пробирок.
- 3) В случае использования 8-капиллярного генетического анализатора внести раствор в один ряд 96-луночного планшета или стрипованных пробирок.
4. Установить 96-луночный планшет или стрипованные пробирки с приготовленным раствором в генетический анализатор.

7.2.1.3. Запуск спектральной калибровки

1. Открыть программу **Data Collection Software**. Кликнуть по клавише «**Maintenance**» в верхней строке или «**Wizard**» (рисунок 11).

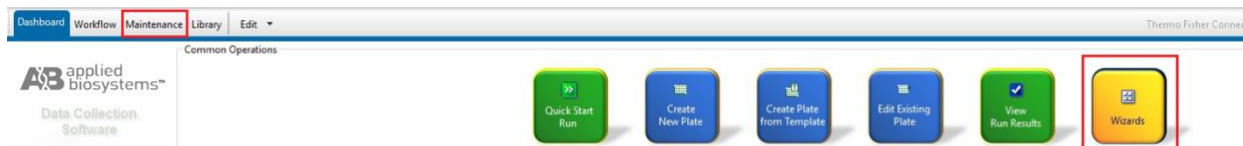


Рисунок 11

2. В открывшейся вкладке слева в разделе «**Calibrate**» выбрать «**Spectral**» (рисунок 12).

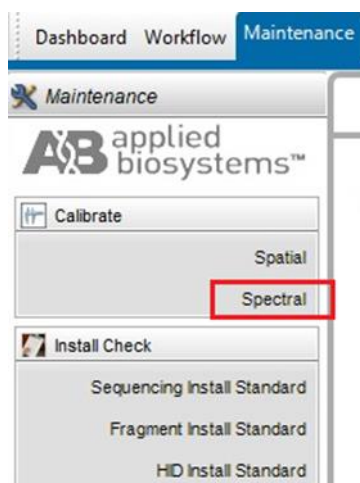


Рисунок 12

3. В открывшемся окне «**Calibration Run**» указать «**Number of Wells**» – количество лунок в используемом планшете, «**Plate Position**» – позицию планшета в приборе (рисунок 13). В поле «**Chemistry Standard**» из выпадающего списка выбрать **Matrix Standard**, в поле «**Dye Set**» из выпадающего списка выбрать «**Spectrum 6A**», а в поле

«Starting Well» указать номер первого стрипа в планшете, который содержит смесь калибратора с формамидом.

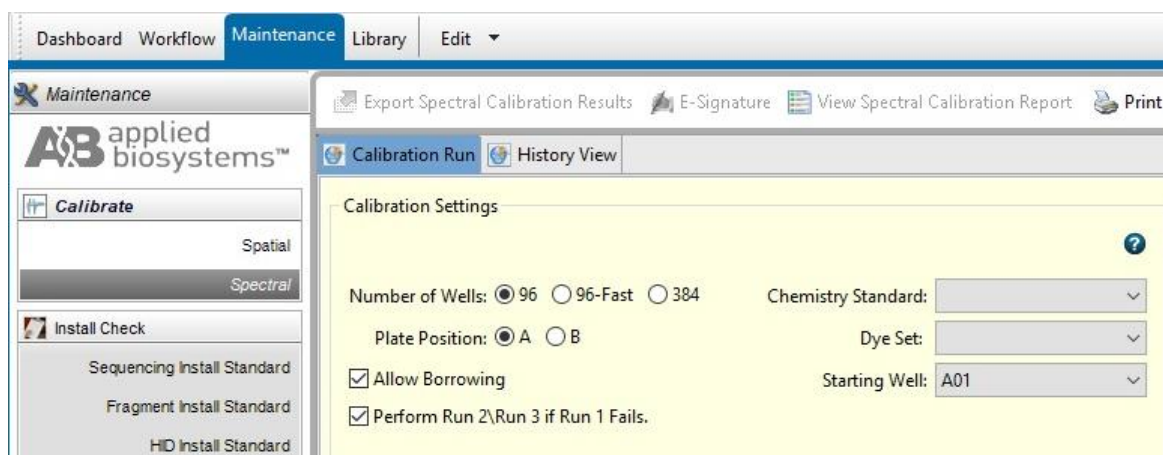


Рисунок 13

4. Нажать на кнопку «**Start Run**» для запуска спектральной калибровки.
5. После завершения калибровки нажать кнопку «**Accept**» в нижней части окна.

7.2.2. Подготовка продуктов амплификации

1. В отдельной пробирке смешать **формамид** (Di-Fa или Hi-Di) и стандарт длин **СД-520** в соотношении согласно таблице 14.

Таблица 14 – Расход реагентов формамид и СД-520

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Формамид (Di-Fa или Hi-Di)	10
СД-520	1

ВАЖНО! При проведении исследования в объеме реакции 10 мкл необходимо приобрести дополнительную пробирку с реагентом СД-520 (кат. № СД-520, ООО «НФП Синтол»).

Примечание – При расчете объемов компонентов смеси, необходимых для всего анализа, следует учесть, что как минимум одна лунка планшета/стрипа при анализе каждой серии образцов должна содержать аллельную лестницу.

2. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить **10 мкл** смеси в каждую лунку планшета/стрипа.
4. Внести в лунки со смесью по **1 мкл** ПЦР-продукта.
5. В отдельную лунку внести **1 мкл** раствора аллельной лестницы (реагент АЛ).
6. Закрыть планшет/стрип антииспарителем (септой).
7. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
8. Денатурировать образцы в амплификаторе 1 мин при температуре 95 °С, охладить до 4 °С.

ВАЖНО! Нанесение образцов происходит из восьми (3500 Genetic Analyzer) или двадцати четырех (3500xL Genetic Analyzer) лунок ряда одновременно. Не допускается запуск прибора, если в анализируемом ряду имеется хотя бы одна незаполненная лунка. В пустые лунки, не содержащие образцы, следует внести 10 мкл формамида.

- Поместить планшет/стрип в держатель планшета и установить его в генетический анализатор в соответствии с руководством пользователя.

7.2.3. Запуск фрагментарного анализа

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer/3500xL Genetic Analyzer проводится в соответствии с руководством пользователя, предоставляемым производителем.

Рекомендуемые параметры электрофореза для комбинации капилляров 36 см и типа полимера POP4 представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Рекомендуемые значения параметров электрофореза для генетического анализатора 3500 Genetic Analyzer/3500xL Genetic Analyzer

Параметр	Рекомендуемое значение
Injection Voltage, kVolts	1.2
Injection Time, sec.	15
Run Voltage, kVolts	15
Data Delay, sec	1
Run Time, sec	1600

Примечание – Время электрофореза «Run Time» и время исключения регистрации электрофореза «Data Delay» зависят от типа полимера и длины капилляров и настраиваются пользователем в зависимости от используемой комбинации капилляров и полимера.

8. АНАЛИЗ ДАННЫХ

8.1. Анализ данных в программе GeneMarker

8.1.1. Импорт файлов для анализа данных

При первом анализе данных необходимо импортировать файл панели, содержащий информацию о бинах, и файл размерного стандарта. Файлы предоставляются производителем набора. Для импорта файлов необходимо:

- Запустить программу **GeneMarker**. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в выпавшем списке – «**Panel Editor**» (рисунок 14).

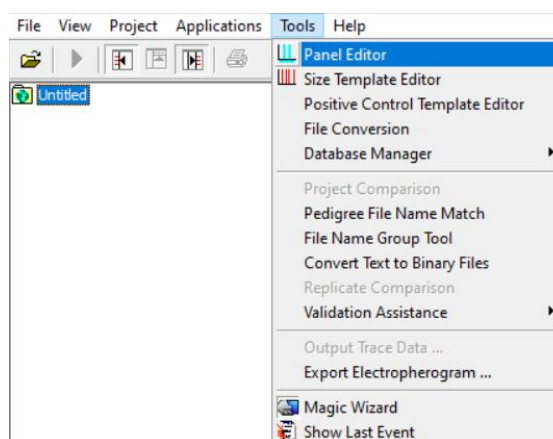


Рисунок 14

- В открывшемся окне выбрать «**File**», в выпавшем списке – «**Import Panels**» (рисунок 15).

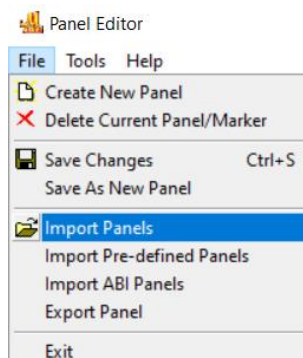


Рисунок 15

3. Выбрать папку с файлом панели (Human ID) и подгрузить его в программу **GeneMarker**.
4. Закрывать окно «**Panel Editor**».
5. Затем в верхнем меню выбрать «**Tools**», в выпавшем списке – «**Size Template Editor**» (рисунок 16).

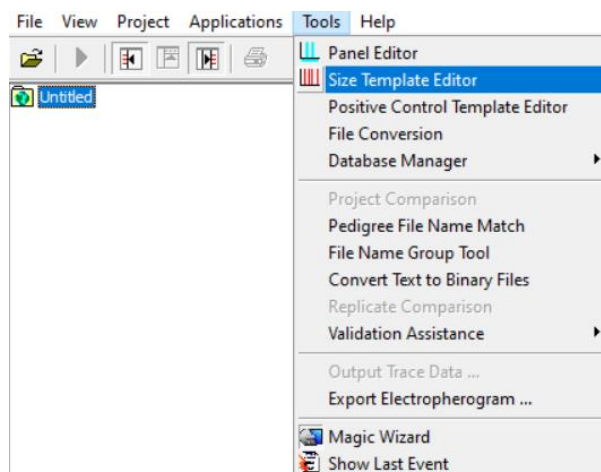


Рисунок 16

6. В открывшемся окне выбрать «**File**», в выпавшем списке – «**Import Size Standard**» (рисунок 17).



Рисунок 17

7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (CD-520) и подгрузить его в программу **GeneMarker**.
8. Закрывать окно «**Size Template Editor**».

8.1.2. Создание проекта анализа данных

1. Запустить программу **GeneMarker**. Кликнуть по иконке «**Open Data**» в окне «**Start your project**» (рисунок 18).

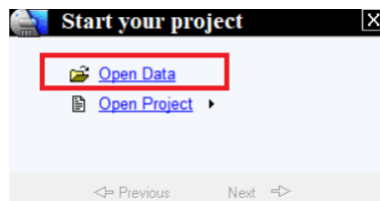


Рисунок 18

2. Нажать «**Add**» и загрузить нужные файлы (рисунок 19).

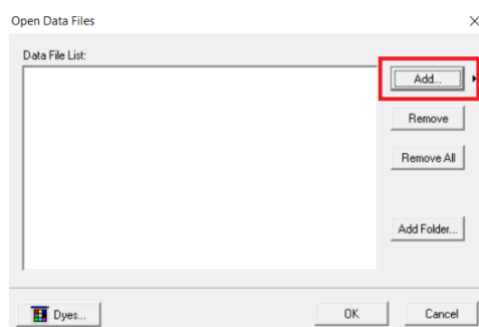


Рисунок 19

3. После добавления файлов нажать «**OK**».
4. Выбрать файл аллельной лестницы в списке слева, кликнуть правой клавишей мыши и установить тип образца как «**Ladder Sample**» (рисунок 20).

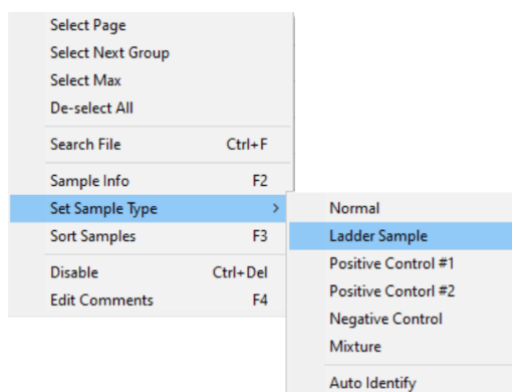


Рисунок 20

5. Выбрать файл положительного контрольного образца в списке слева, кликнуть правой клавишей мыши и установить тип образца как «**Positive Control#1**».
6. Выбрать файл отрицательного контрольного образца в списке слева, кликнуть правой клавишей мыши и установить тип образца как «**Negative Control**».
7. Запустить анализ, нажав на клавишу «**Run Project**» в верхнем меню (рисунок 21).



Рисунок 21

8. В открывшемся окне «**Run Wizard**» в графе «**Panel**» выбрать панель «**Human ID**», в графе «**Size Standard**» выбрать размерный стандарт «**CD-520**» и нажать «**Next**».

9. В следующем окне в графе «**Min Intensity**» (минимальная высота пиков между локусами) установить значение, отсекающее артефактные пики между локусами (например, 500) и нажать «**Next**».
10. Параметры в следующем окне оставить без изменения и нажать «**OK**».

8.1.3. Анализ размерного стандарта

1. Необходимо убедиться, что во всех образцах правильно подписан размерный стандарт. Для этого в верхней панели нужно нажать на кнопку «**Size Calibration**» (рисунок 22).



Рисунок 22

2. В открывшемся окне «**Calibration Charts**» проверить все образцы по списку и убедиться, что оценка качества размерного стандарта не ниже 96 баллов из 100. Если это верно для всех образцов, то дальнейшие действия не требуются, окно можно закрыть.

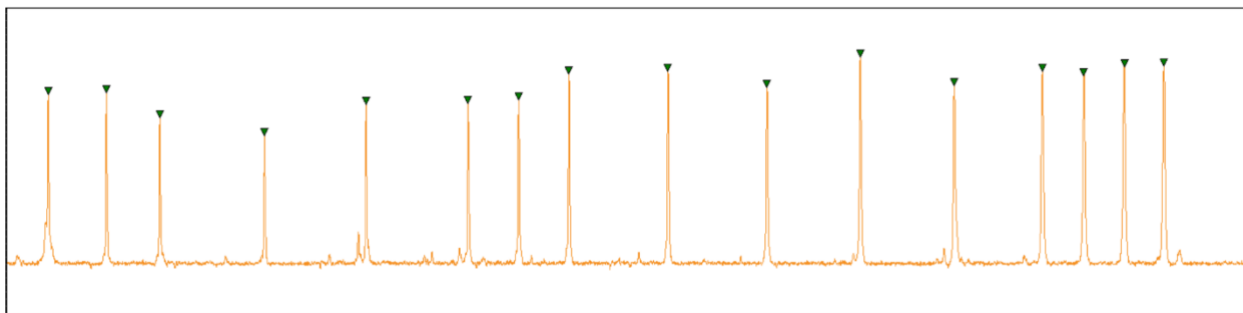


Рисунок 23

3. Если для каких-то образцов оценка качества размерного стандарта ниже 96 баллов, его нужно проверить, и, возможно, переподписать. Для этого в списке образцов выбрать нужный образец нажатием левой кнопки мыши.
4. Верхний график – это виртуальный размерный стандарт, построенный программой для проверки, на него нужно ориентироваться визуально. График ниже – размерный стандарт выбранного образца. Нужно убедиться, что паттерн подписанных пиков нижнего графика совпадает с паттерном пиков верхнего графика. Подписанные пики имеют зеленые треугольники на вершинах (рисунок 23).
5. Если на каких-то пиках треугольников не хватает, нужно их проставить, нажав правой кнопкой мыши на нужный пик и выбрав в выпавшем меню «**Add Peak**». Для удобства график можно масштабировать.
6. Лишние пики можно удалить, нажав на них правой кнопкой мыши и выбрав «**Delete Peak**».
7. По окончании корректировки пиков стандарта выбранного образца, нужно правой кнопкой мыши нажать на свободное поле между пиками и в выпадающем меню выбрать «**Update Calibration**». Повторить процедуру для всех образцов, качество размерного стандарта которых ниже 96 баллов. Закрыть окно «**Calibration Charts**» и приступить к анализу **Аллельной лестницы**.

8.1.4. Анализ аллельной лестницы

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с **Аллельной лестницей** (рисунок 24).

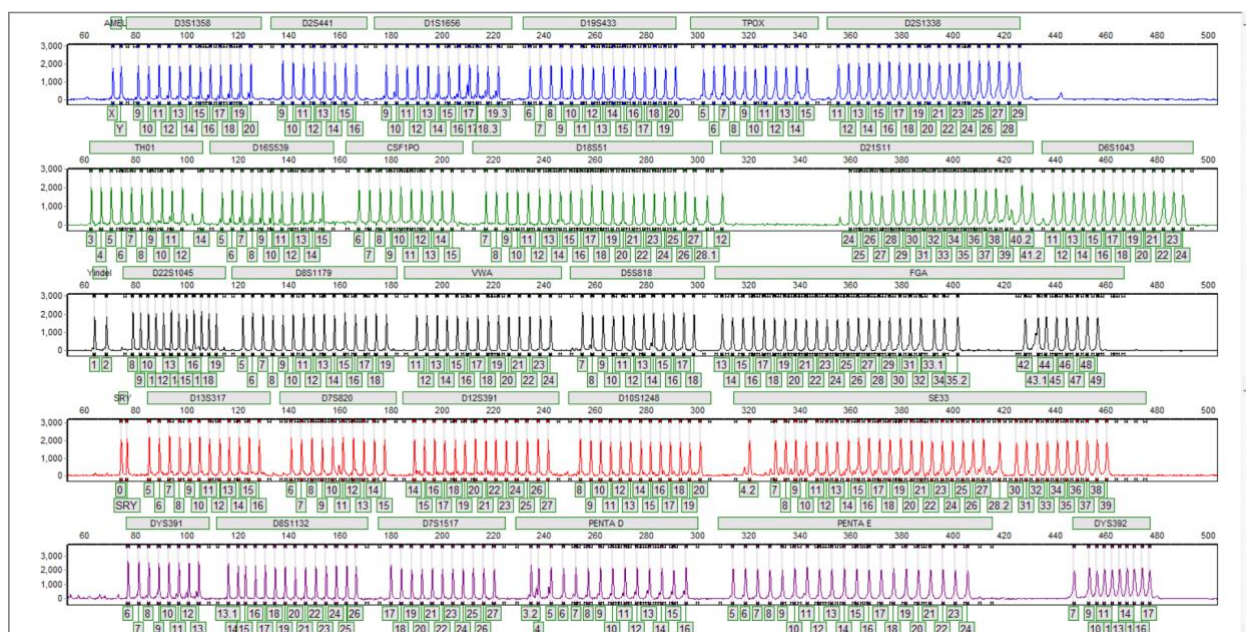


Рисунок 24

2. В верхнем меню выбрать канал «**Blue**», используя клавишу «**Show Dye**».
3. Убедиться, что всем пикам **Аллельной лестницы** по каналу «**Blue**» присвоено верное значение аллеля (см. таблицу 16).
4. В верхнем меню выбрать канал «**Green**», используя клавишу «**Show Dye**».
5. Убедиться, что всем пикам **Аллельной лестницы** по каналу «**Green**» присвоено верное значение аллеля (см. таблицу 16).
6. В верхнем меню выбрать канал «**Yellow**», используя клавишу «**Show Dye**».
7. Убедиться, что всем пикам **Аллельной лестницы** по каналу «**Yellow**» присвоено верное значение аллеля (см. таблицу 16).
8. В верхнем меню выбрать канал «**Red**», используя клавишу «**Show Dye**».
9. Убедиться, что всем пикам **Аллельной лестницы** по каналу «**Red**» присвоено верное значение аллеля (см. таблицу 16).
10. В верхнем меню выбрать канал «**Purple**», используя клавишу «**Show Dye**».
11. Убедиться, что всем пикам **Аллельной лестницы** по каналу «**Purple**» присвоено верное значение аллеля (см. таблицу 16).

Таблица 16 – Аллели, входящие в состав аллельной лестницы

Канал детекции	Лocus	Диапазон аллелей	Аллели
Blue	Amelogenin	X	X
		Y	Y
	D3S1358	8-21	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
	D2S441	8-17	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	D1S1656	8-21	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17.3, 18.3, 19.3
	D19S433	5.2-20	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
	TPOX	4-16	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
Green	D2S1338	10-29	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
	TH01	3-14	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14
	D16S539	4-16	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
	CSF1PO	5-16	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15

Канал детекции	Локус	Диапазон аллелей	Аллели
	D18S51	6-28.3	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28.1
	D21S11	12-41.2	12, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40.2, 41.2
	D6S1043	10-25	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
Yellow	Yindel (rs2032678)	1-2	1, 2
	D22S1045	7-20	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
	D8S1179	4-20	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
	vWA	10-25	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
	D5S818	6-19	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
	FGA	12.2-51.2	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33.1, 34.1, 35.2, 42, 43.1, 44, 45, 46, 47, 48, 49
Red	SRY	SRY	SRY
	D13S317	5-17	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	D7S820	5-16	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
	D12S391	13-28	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
	D10S1248	7-21	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
	SE33	3-43	4.2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28.2, 30, 31, 32, 33, 34, 32, 36, 37, 38, 39
Purple	DYS391	6-14	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
	D8S1132	12.1-27	13.1, 14.1, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26
	D7S1517	16-28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
	Penta D	2.2-17	3.2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	Penta E	5-25	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
	DYS392	3-21	7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17

8.1.5. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с ПКО.
2. В верхнем меню, используя клавишу «Show Dye», поочередно выбрать канал «Blue», «Green», «Yellow», «Red», «Purple», убедиться, что всем пикам ПКО присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 1, рисунок 25).

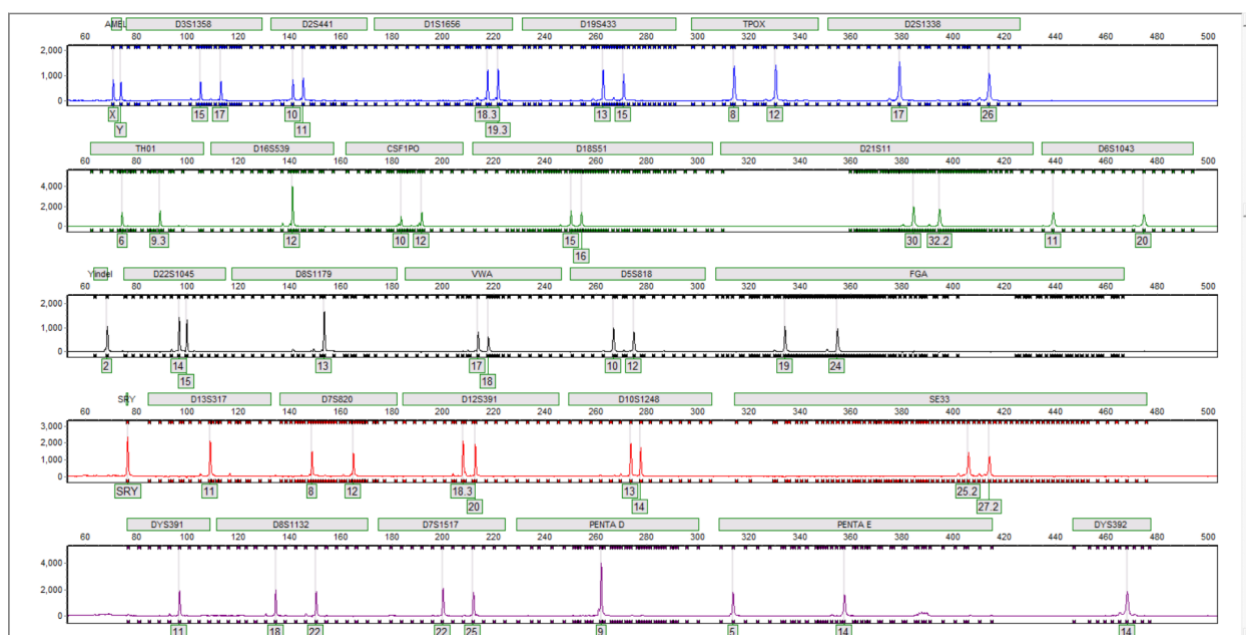


Рисунок 25

8.1.6. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с ОКО.

2. Убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

8.1.7. Анализ образца

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу образца.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал, используя клавишу «**Show Dye**».
3. Убедиться, что всем пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля.
4. Повторить действие со всеми каналами.

8.2. Анализ данных в программе GeneMapper

8.2.1. Импорт файлов для анализа данных

При первом анализе данных необходимо импортировать файл панели, бинов, а также файл размерного стандарта. Файлы предоставляются производителем набора. Для импорта файлов необходимо:

1. Запустить программу **GeneMapper**, в верхнем меню нажать «**Tools**», в выпавшем списке выбрать «**Panel Manager**».
2. В открывшемся окне слева нажать «**Panel Manager**».
3. В верхнем меню нажать «**File**», в выпавшем списке выбрать пункт «**Import Panels**».
4. Выбрать папку с файлом панели (GrHuman) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».
5. Щелкнуть по папке GrHuman, появившейся в списке «**Panel Manager**».
6. В верхнем меню нажать «**File**», в открывшемся списке выбрать пункт «**Import Bin Set**».
7. Выбрать папку с файлом бинов (Human ID_bins) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**Panel Editor**».
8. В верхнем меню нажать «**Tools**», в открывшемся списке выбрать «**GeneMapper Manager**».
9. В верхней строке открывшегося окна перейти на вкладку «**Size Standards**» и нажать кнопку «**Import**».
10. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (CD-520) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».
11. Перейти на вкладку «**Analysis Method**» и нажать кнопку «**Import**».
12. Выбрать папку с файлом метода (Human ID_method) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**GeneMapper Manager**».

8.2.2. Анализ данных

1. В программе **GeneMapper** в верхнем меню выбрать «**File**», в открывшемся списке выбрать «**Add Samples to Project**».
2. В открывшемся окне выбрать папку с файлами для анализа и нажать кнопку «**Add to list**» внизу под списком папок.
3. Выбранная папка появится в окне справа, внизу нажать кнопку «**Add**».
4. Для образцов выбрать ранее импортированные в программу: «**Panel**» – Human ID, «**Size Standard**» – CD-520, «**Analysis Method**» – Human ID_method.
5. Запустить анализ.

8.2.3. Анализ размерного стандарта

1. Необходимо убедиться, что во всех образцах правильно подписан размерный стандарт. Для этого нужно проверить значения SQ для всех образцов в проекте. Если SQ – зеленый квадрат, то размерный стандарт этого образца подписан верно. Если SQ – желтый треугольник или красный круг, то стандарт необходимо проверить.

Well	SE	SGO	ARNM	SFNF	MNF	SNF	SOS	SQ
A07				■	■	■	▲	●
B07				■	■	■	▲	●
C07				■	■	■	▲	●
D07				■	■	■	▲	●

Рисунок 26

2. Для этого нужно выделить все проверяемые образцы и в верхней панели нажать на кнопку «Size Match Editor».
3. В открывшемся окне из списка слева нужно поочередно выбирать образцы для проверки нажатием левой кнопки мыши. На графике справа будут отображаться их размерные стандарты.
4. Неправильно подписанный пик можно удалить или переименовать, нажав на него правой кнопкой мыши. Неподписанный пик также можно подписать.
5. По окончании редактирования размерного стандарта нужно нажать кнопку внизу «Apply», затем – кнопку «OK». После проверки и исправления всех образцов окно «Size Match Editor» можно закрыть. Далее можно приступить к анализу Аллельной лестницы.

8.2.4. Анализ аллельной лестницы

1. Открыть файл Аллельной лестницы.
2. Удостовериться, что все аллели, входящие в состав аллельной лестницы, расположены в диапазонах бинов панели «Human ID», и им присвоено верное значение аллеля (см. таблицу 16).

8.2.5. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

1. Открыть образец ПКО.
2. В верхнем меню поочередно включать синий, зеленый, желтый, красный каналы, убедиться в том, что всем пикам ПКО присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 1).
3. Если присвоенное значение аллеля не соответствует значению в таблице, необходимо настроить панель.
4. Для настройки панели необходимо закрыть окно с образцом. В верхнем меню выбрать «Tools» в открывшемся списке выбрать «Panel Manager».
5. В открывшемся окне выбрать папку Human ID. В ней открыть папку Human ID, в результате отобразится список всех локусов.
6. В верхнем меню нажать кнопку «Add Reference Data».
7. В открывшемся окне внизу слева выбрать папку с данными постановки, выбрать образец ПКО. Нажать «Add To List».
8. Справа появятся выбранные папка и файл. Внизу справа нажать кнопку «Add».
9. В предыдущем окне слева появятся выбранные референсные образцы. Выбрать из списка локус, который необходимо редактировать, внизу выбрать образец ПКО.

10. В открывшемся окне отключить все каналы, кроме редактируемого. Внизу нажать на горизонтальную линию диапазона локуса для отображения границ локуса. Расширить границы локуса и сдвинуть бины локуса, при этом диапазон промежутков между аллелями должен быть сохранен.
11. Проверить, что всем пикам ПКО были присвоены верные значения.
12. После настройки значений локуса нажать кнопку «Apply».
13. Повторить действия со всеми локусами, которым были неверно присвоены аллельные состояния.
14. Нажать кнопку «OK».

8.2.6. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

1. Открыть образец ОКО.
2. Убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

8.2.7. Анализ образца

1. Открыть образец.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал.
3. Убедиться, что всем пикам анализируемого образца по данному каналу присвоено значение аллеля.
4. Повторить действие со всеми каналами.

9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аллельный статус исследуемого образца оценивается по каждому локусу отдельно. Возможно два варианта: гомозиготный – один пик в локусе, гетерозиготный – два пика в локусе.

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
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Использовать до
	Номер по каталогу
	Код партии