

Модель: **RealQuant H3** REF HG-403

RealQuant H3-p REF HG-403p

**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
6.2.1.	Подготовка к проведению ПЦР-РВ при использовании модели «RealQuant H3».....	9
6.2.2.	Подготовка к проведению ПЦР-РВ при использовании модели «RealQuant H3-p».....	11
7.	ПРОГРАММИРОВАНИЕ ПРИБОРА И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-РВ.....	12
7.1.	Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе «АНК-32», «АНК-48».....	12
7.1.1.	Установка шаблонов в программу ANK Shell.....	12
7.1.2.	Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблонов RQ, RQ-F (с проведением калибровки) ..	13
7.1.3.	Создание и использование внутренней калибровочной кривой.....	16
7.1.3.1.	Создание внутренней калибровочной кривой.....	16
7.1.3.2.	Настройка и использование внутренней калибровочной кривой.....	18
7.2.	Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе CFX96.....	21
7.3.	Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТпрайм II».....	23
7.4.	Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе Line-Gene 9660.....	29
7.5.	Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе Gentier 96/Locus Intero.....	37
7.5.1.	Создание шаблона эксперимента.....	37
7.5.2.	Установка готового шаблона.....	40
7.5.3.	Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона «RealQuant H3 (Gentier 96)».....	40
7.5.4.	Создание внутренней калибровочной кривой.....	42
7.5.5.	Использование внутренней калибровочной кривой.....	43
8.	АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	45
8.1.	Обработка результатов работы прибора АНК.....	45

8.2.	Обработка результатов работы прибора CFX96	47
8.3.	Обработка результатов работы прибора «ДТпрайм», «ДТлайт» «ДТпрайм II»	48
8.4.	Обработка результатов работы прибора Line-Gene 9660	50
8.4.1.	Анализ данных	50
8.4.2.	Автоматический расчет степени деградации и разведения для результатов, полученных на приборе Line-Gene 9660	52
8.5.	Обработка результатов работы прибора Gentier-96/Locus Intero	53
8.5.1.	Анализ данных	53
8.5.2.	Автоматический расчет степени деградации и разведения для результатов, полученных на амплификаторе Gentier-96/Locus Intera	54
9.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	56
9.1.	Интерпретация результатов	56
9.2.	Оценка результатов анализа	57
10.	ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	59
11.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	59
12.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА	59

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» (кат. № HG-403) и «RealQuant H3-p» (кат. № HG-403p) предназначены для проведения ПЦР-РВ с использованием следующих приборов: «АНК-32», «АНК-48» («ИАП РАН»), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТпрайм II» (ООО «НПО ДНК-Технология»), Line-Gene 9660 (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd.), Gentier 96/Locus Intero (Tianlong).

Модель набора «RealQuant H3» (кат. № HG-403) включает пробирку с реакционным буфером и пробирку со смесью специфических праймеров и зондов для приготовления реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ. Модель рассчитана на проведение 100 реакций, включая контрольные образцы.

Модель набора «RealQuant H3-p» (кат. № HG-403p) включает готовую реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ, раскапанную по стрипованным пробиркам объемом 0,2 мл. Модель рассчитана на проведение 104 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	aS	короткий фрагмент аутосомной ДНК	FAM
2	aL	длинный фрагмент аутосомной ДНК	R6G/HEX
3	Y	ДНК Y-хромосомы	ROX
4	IPC	внутренний положительный контроль	Cy5

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

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

Фрагмент 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», «RealQuant H3-p»

№	Компонент	Описание	Номинальный объем, мл	Количество
Модель «RealQuant H3»				
1.	РБ-RQ	Реакционный буфер для ПЦР	1,0	1 пробирка
2.	СПЗ-RQ	Смесь специфических праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для ПЦР	1,0	1 пробирка
3.	ПКО RQ	Положительный контрольный образец, содержащий синтетические фрагменты различной длины аутомсомной ДНК и Y-хромосомы человека в концентрации 50 нг/мкл	0,03	1 пробирка
4.	ДНК-буфер	Буфер для разведения ПКО RQ	1,2	1 пробирка
5.	ОКО	Отрицательный контрольный образец	0,2	1 пробирка
Модель «RealQuant H3-p»				
1.	PC-RQ+	Готовая реакционная смесь для ПЦР, содержащая специфические праймеры и флуоресцентно-меченые зонды	0,02	104 пробирки (13 стрипов по 8 пробирок)
2.	ПКО RQ	Положительный контрольный образец, содержащий синтетические фрагменты различной длины аутомсомной ДНК и Y-хромосомы человека в концентрации 50 нг/мкл	0,03	1 пробирка
3.	ДНК-буфер	Буфер для разведения ПКО RQ	1,2	1 пробирка
4.	ОКО	Отрицательный контрольный образец	0,2	1 пробирка

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
Птицы	курица
	гусь
Рыбы	карп

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, R6G/HEX, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам) («АНК-32», «АНК-48» («ИАП РАН»), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТпрайм II» (ООО «НПО ДНК-Технология»), Line-Gene 9660 (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd.), Gentier 96/Locus Intero (Tianlong));
- 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 - при использовании модели набора «RealQuant H3»;
- пленка для ПЦР-планшетов или плоские 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-РВ 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 (КО1).

2. Отобрать и маркировать (КО2, КО3, КО4, КО5) 4 микроцентрифужных пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.
3. Внести в промаркированные пробирки по 90 мкл ДНК-буфера.
4. Приготовить калибровочные образцы КО2, КО3, КО4, КО5 путем разведения ПКО RQ (КО1) согласно протоколу, указанному в таблице 4.

Таблица 4 – Приготовление калибровочных образцов КО2, КО3, КО4, КО5

Стандарт	Концентрация, нг/мкл	Приготовление	Разведение
КО1	50	ПКО RQ в исходной концентрации	-
КО2	5	90 мкл ДНК-буфера + 10 мкл КО1	10х
КО3	0,5	90 мкл ДНК-буфера + 10 мкл КО2	10х
КО4	0,05	90 мкл ДНК-буфера + 10 мкл КО3	10х
КО5	0,005	90 мкл ДНК-буфера + 10 мкл КО4	10х

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

ВАЖНО! После добавления образца КО 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-РВ

6.2.1. Подготовка к проведению ПЦР-РВ при использовании модели «RealQuant H3»

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

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

Реагент	Расход реагента	
	на 1 реакцию, мкл	рекомендуемое количество для N образцов
РВ-RQ	10	10 x (N+12)
СПЗ-RQ	10	10 x (N+12)
Обозначения: N – количество исследуемых образцов; 12 – контрольные образцы (КО, ОКО) в двух повторах.		

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

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

Примечание - После размораживания допускается хранение *РБ-RQ* и *СПЗ-RQ* 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-RQ* 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 (ОКО), калибровочные образцы КО5, КО4, КО3, КО2, КО1. Заккрыть 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 толщ РС наверх. Снова центрифугировать микропробирки 30 с при 3000 об/мин.

- Поместить пробирки в прибор для ПЦР-РВ в соответствии с рисунком 1 или 2, где КО – калибровочный образец, ОКО – отрицательный контрольный образец, ИО – исследуемый образец.

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

Рисунок 1 – Рекомендуемый порядок размещения образцов в приборе «АНК»

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КО1	КО1										
B	КО2	КО2										
C	КО3	КО3										
D	КО4	КО4										
E	КО5	КО5										
F	ОКО	ОКО										
G	ИО1	ИО...										
H	ИО2											

Рисунок 2 – Рекомендуемый порядок размещения образцов в приборах «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТпрайм II», CFX96, Line-Gene 9660, Gentier 96/Locus Intero

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

6.2.2. Подготовка к проведению ПЦР-РВ при использовании модели «RealQuant H3-p»

- 1 Разморозить требуемое количество стрипованных пробирок с *PC-RQ+*, кратковременно центрифугировать для сброса капель.
- 2 Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в микропробирки (на стенку) по 2 мкл исследуемых образцов (ИО), отрицательный контрольный образец (ОКО), калибровочные образцы КО5, КО4, КО3, КО2, КО1. Заккрыть пробирки.
- 3 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 толщк РС наверх. Снова центрифугировать микропробирки 30 с при 3000 об/мин.

- 4 Поместить пробирки в прибор для ПЦР-РВ в соответствии с рисунком 3 или 4, где КО – калибровочный образец, ОКО – отрицательный контрольный образец, ИО – исследуемый образец.

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

Рисунок 3 – Рекомендуемый порядок размещения образцов в приборе «АНК»

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КО1	КО1										
B	КО2	КО2										
C	КО3	КО3										
D	КО4	КО4										
E	КО5	КО5										
F	ОКО	ОКО										
G	ИО1	ИО...										
H	ИО2											

Рисунок 4 – Рекомендуемый порядок размещения образцов в приборах «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТпрайм II», CFX96, Line-Gene 9660, Gentier 96/Locus Intero

- 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 «АНК-32», «АНК-48»

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

Существуют несколько различных шаблонов для работы с набором «RealQuant H3» на приборе «АНК», устанавливаемые в зависимости от модели прибора (см. таблицу 6).

Таблица 6 – Шаблоны для программного обеспечения «АНК-32»/«АНК-48»

Название шаблона	Совместимость с моделью «АНК»	Описание шаблона
RQ	«АНК-32», «АНК-48»	Стандартный шаблон для проведения анализа с обязательной постановкой калибровки
RQ-test	«АНК-32», «АНК-48»	Шаблон с использованием внутренней калибровки, предварительно полученной при использовании шаблона RQ
RQ-F	«АНК-48»	Шаблон для быстрой ПЦР (40 мин) с обязательной постановкой калибровки
RQ-F-test	«АНК-48»	Шаблон для быстрой ПЦР (40 мин) с использованием внутренней калибровки, предварительно полученной при использовании шаблона RQ-F

7.1.1. Установка шаблонов в программу ANK Shell

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Для установки шаблона открыть программу **ANK Shell**, открыть папку «Новое исследование» (рисунок 5).

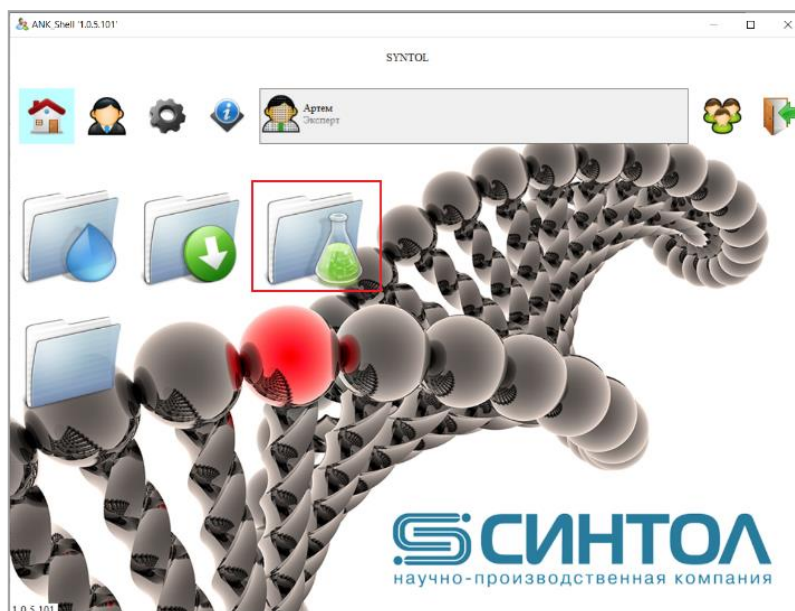


Рисунок 5

3. В открывшемся окне выбрать функцию «Импорт шаблона» (рисунок 6).

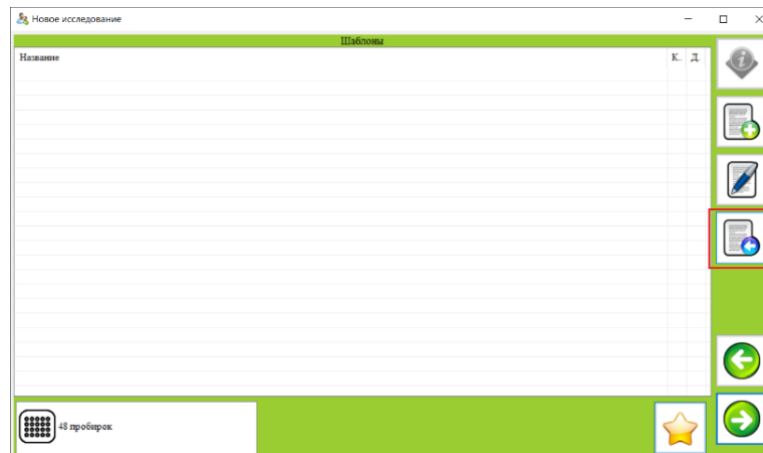


Рисунок 6

4. В проводнике выбрать файл шаблона и нажать клавишу «Открыть» (рисунок 7). Шаблон будет установлен в программу ANK Shell.

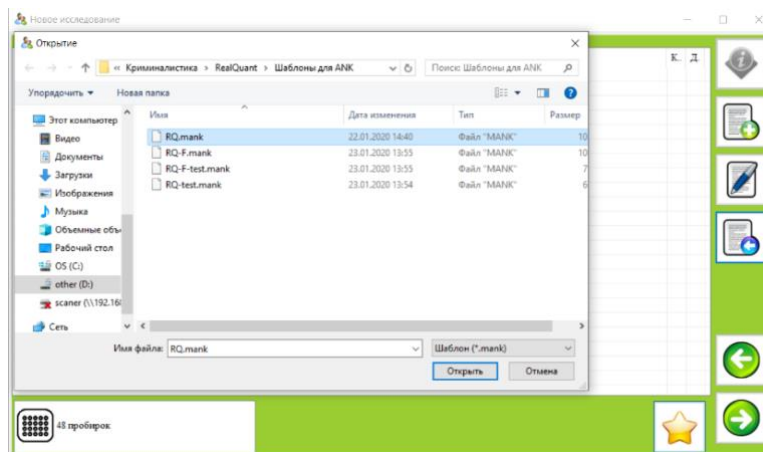


Рисунок 7

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

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации.
2. Открыть программу **ANK Shell**, открыть папку «**Новое исследование**». В открывшемся окне выбрать нужный шаблон: **RQ/ RQ-F** (рисунок 8). В левом нижнем углу окна указать тип прибора.

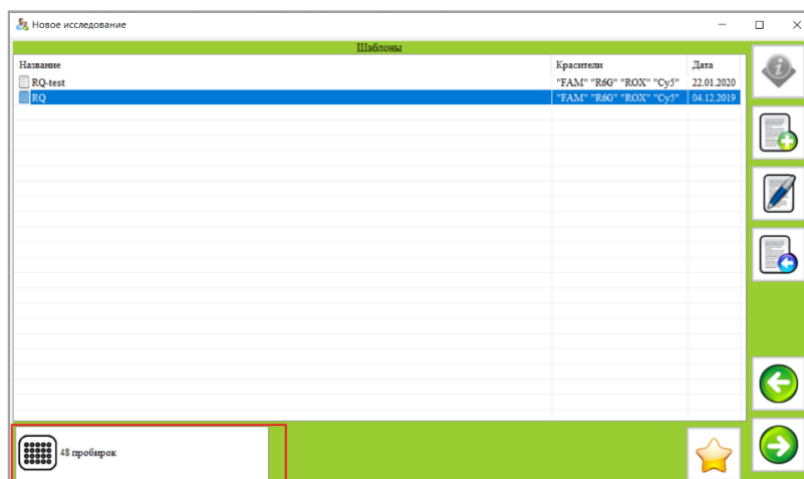


Рисунок 8

3. Нажать клавишу «Далее»  в правом нижнем углу окна.
4. Установить повторность исследуемых образцов (ИО) и их число (рисунок 9).

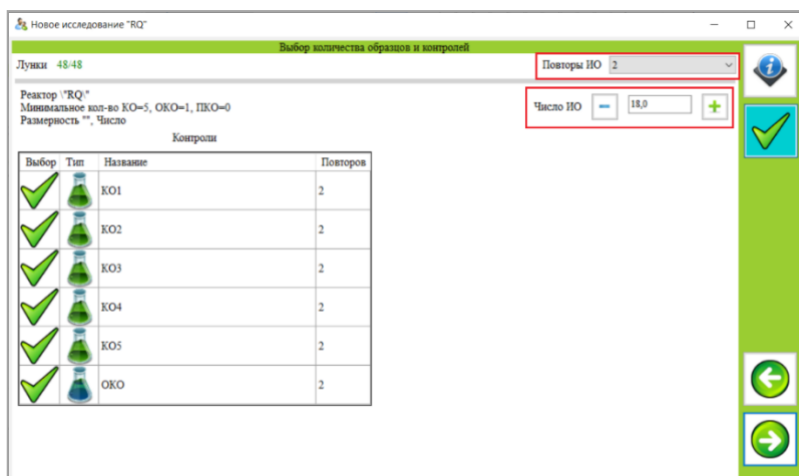


Рисунок 9

5. Нажать клавишу «Далее»  в правом нижнем углу окна (рисунок 9).
6. Внести названия исследуемых образцов (рисунок 10).

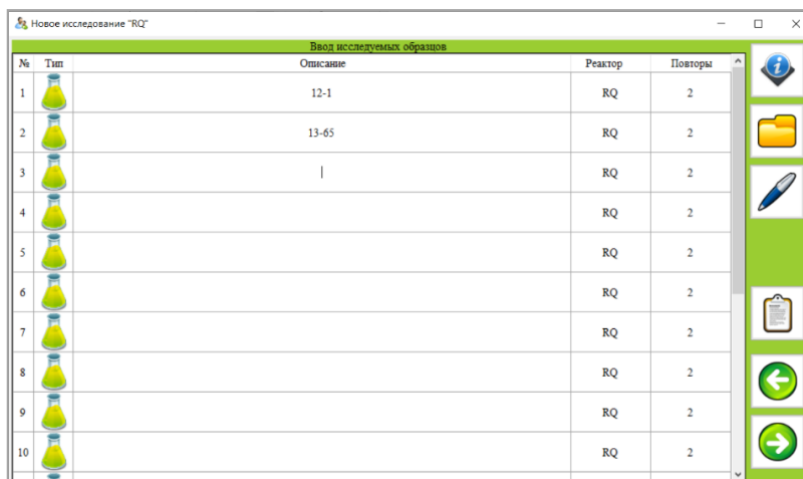


Рисунок 10

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

7. Нажать клавишу «Далее»  в правом нижнем углу окна (рисунок 10).
8. Расставить калибровочные образцы (КО), отрицательные образцы (ОКО) и исследуемые образцы (ИО) в порядке следования образцов в плашке прибора (см. рисунок 1, 3 и 11). Для расстановки образцов существует два способа:
 - а) Расстановка образцов вручную с помощью курсора «мышки»;
 - б) Автоматическая расстановка (клавиша «Цветная плашка» справа, см. рисунок 12), если порядок следования образцов (КО, ОКО и ИО) в приборе совпадает с порядком, рекомендуемым в п. 6.2.

Примечание - Для сброса расстановки можно использовать клавишу «Сброс» .

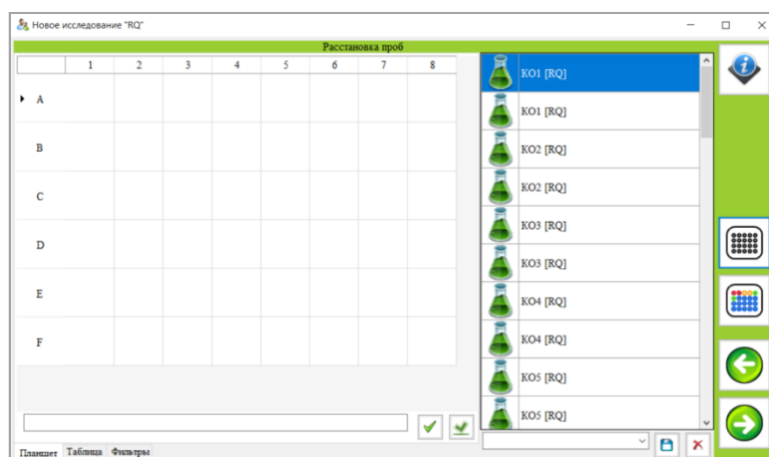


Рисунок 11

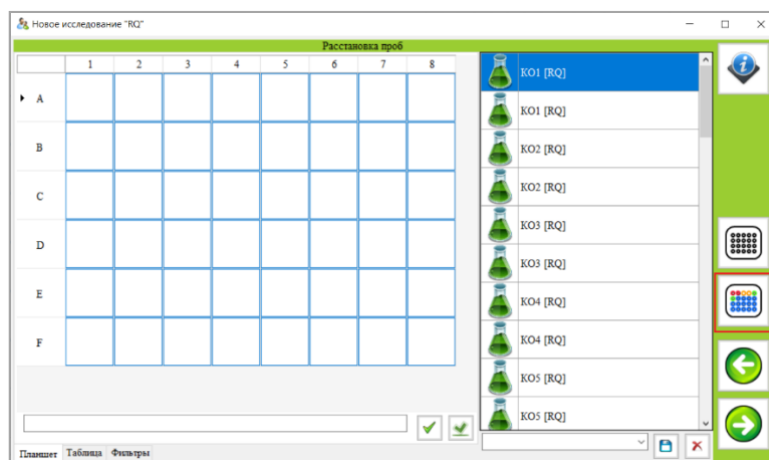


Рисунок 12

9. Нажать клавишу «Далее»  в правом нижнем углу окна (рисунок 12).
10. Ввести название файла, номер серии набора реагентов «RealQuant H3» и, по необходимости, комментарий (рисунок 13).

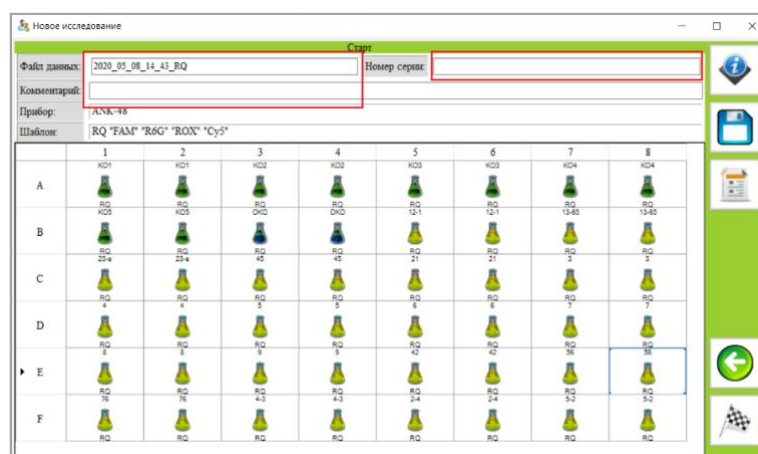


Рисунок 13

11. Нажать клавишу «Старт»  в правом нижнем углу (рисунок 13).
12. Во всплывшем окне выбрать прибор по серийному номеру и нажать клавишу «Пуск» .

7.1.3. Создание и использование внутренней калибровочной кривой

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

Для использования функции внутренней калибровки, при поступлении новой серии наборов «RealQuant H3», необходимо провести ПЦР-РВ с использованием КО, а затем сохранить калибровочную кривую, полученную в результате постановки.

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

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.

7.1.3.1. Создание внутренней калибровочной кривой

1. Используя шаблон **RQ** или **RQ-F** (в зависимости от типа циклограммы (быстрой или стандартной)), провести ПЦР-РВ с получением калибровочной кривой.
2. После проведения ПЦР-РВ убедиться, что калибровочная кривая соответствует необходимым параметрам по каждому из красителей. Для этого в правом нижнем углу экрана кликнуть по графе «Калибровка» (рисунок 14).

Для **калибровочной кривой** должны выполняться **все** нижеперечисленные условия:

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

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

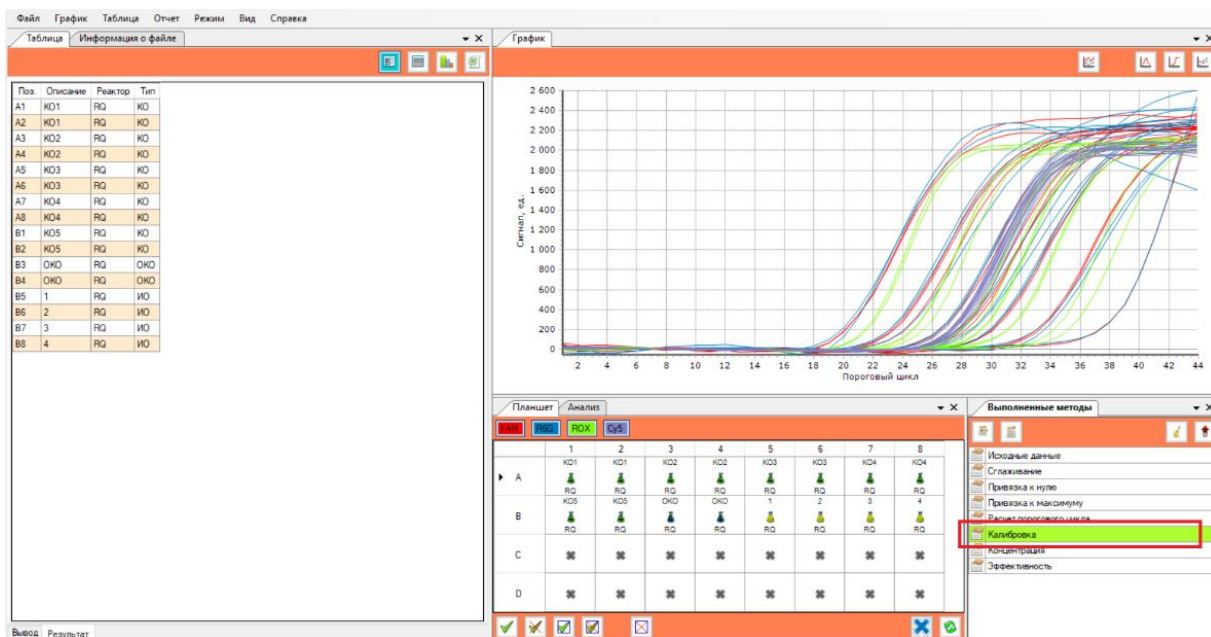


Рисунок 14

3. В открывшемся окне выбрать поочередно каждый краситель и удостовериться, что значения **Eff** и R^2 отвечают требуемым критериям (рисунок 15).

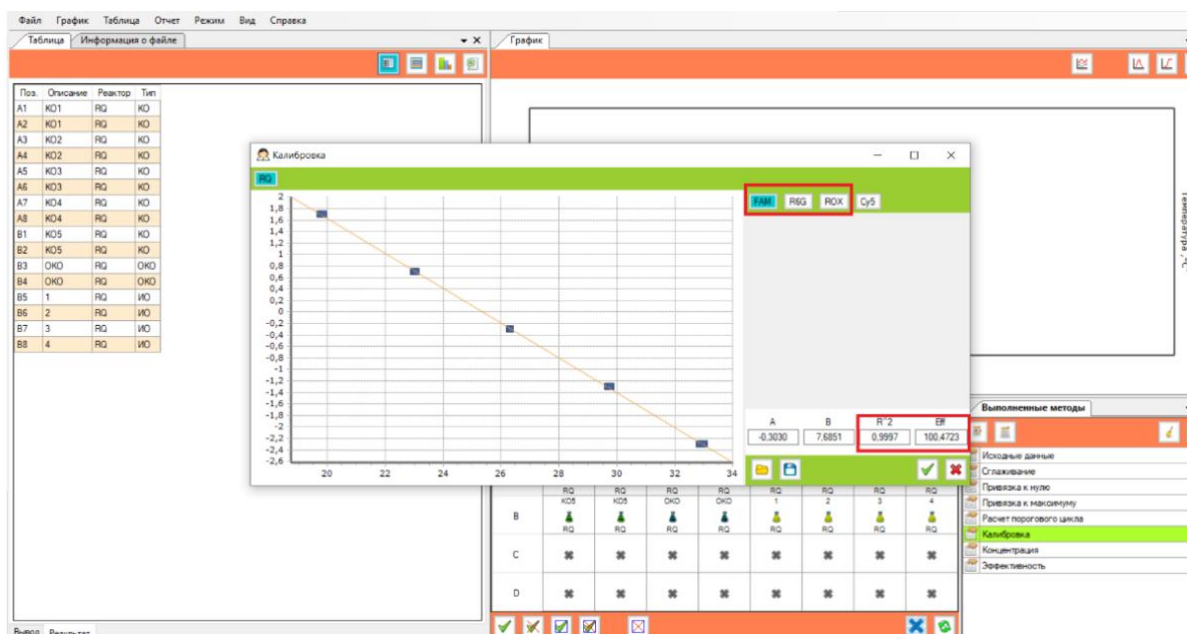


Рисунок 15

4. Если значения **Eff** и **R²** укладываются в требуемые параметры, кликнуть по иконке «Сохранить» (рисунок 16).

ВАЖНО! Если значения **Eff** и **R²** не соответствуют критериям, необходимо вновь провести ПЦР-РВ с приготовленными КО. Если параметры калибровочной кривой снова не будут соответствовать требуемым значениям, приготовить новые калибраторы и провести ПЦР-РВ. **Использовать для количественного анализа калибровочную кривую с параметрами, не соответствующими требуемым критериям, запрещено.**

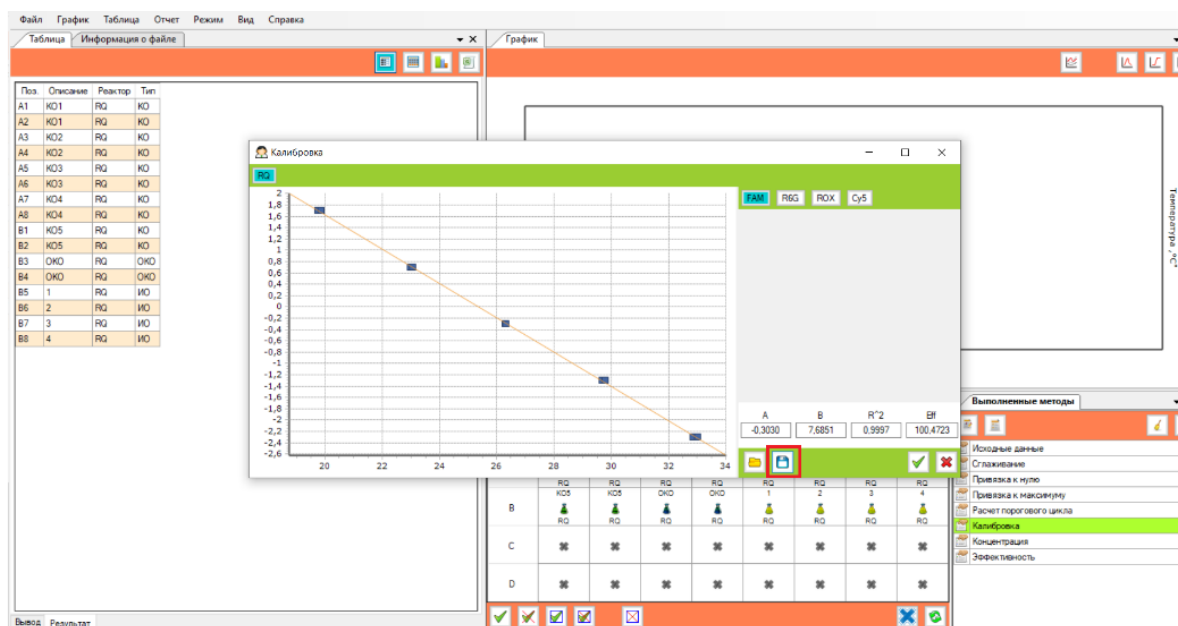


Рисунок 16

5. Во всплывшем окне сохранить файл калибровки с использованием названия набора и датой получения калибровки (рисунок 17). Сохраненный файл с калибровочной кривой можно использовать для расчета концентрации ДНК в исследуемых образцах при последующих постановках ПЦР-РВ на этой серии наборов.

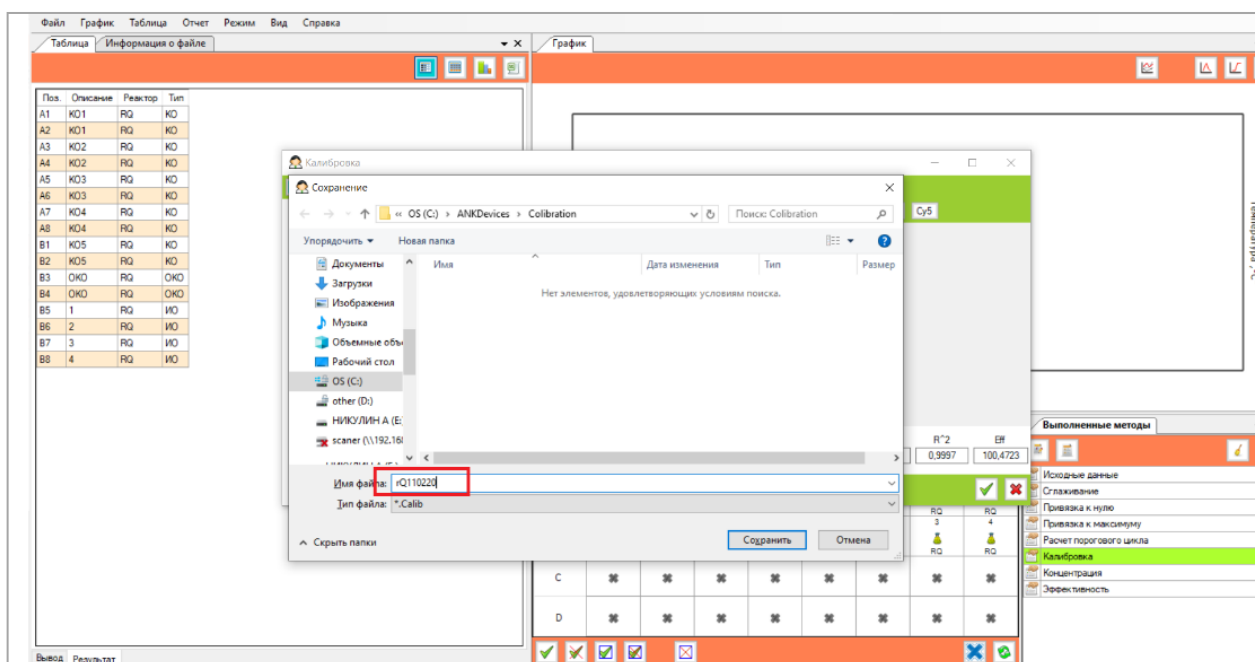


Рисунок 17

7.1.3.2. Настройка и использование внутренней калибровочной кривой

1. Для использования при расчете концентрации ДНК в исследуемых образцах внутренней калибровочной кривой необходимо при запуске ПЦР-РВ в программе **ANK Shell** выбрать шаблон **RQ-test** или **RQ-F-test** (в зависимости от типа шаблона, который был выбран при получении калибровки - см. таблицу 6).
2. Провести ПЦР-РВ с исследуемыми образцами, используя из контролей только **ОКО** (отрицательный контрольный образец) и калибровочный образец **КО2** в качестве положительного контрольного образца.
3. После прохождения ПЦР-РВ открыть файл с результатами исследования. Во время анализа данных появится окно, в котором кликнуть по правой иконке (рисунок 18).

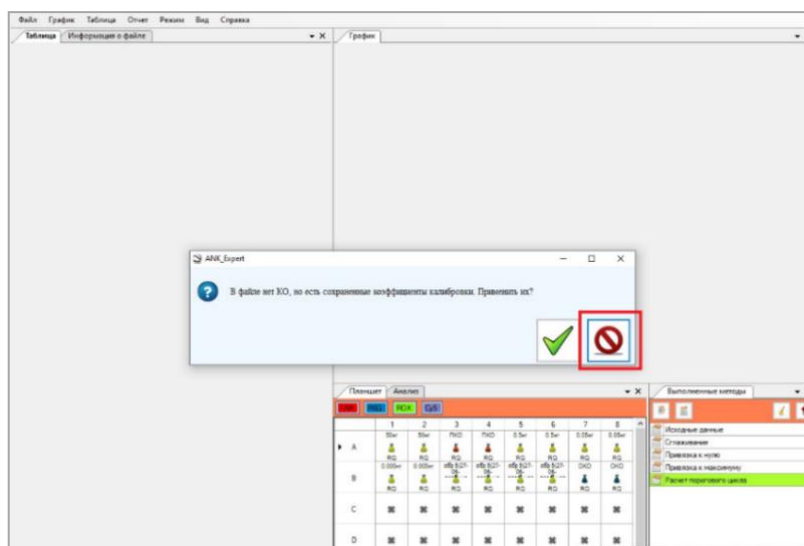


Рисунок 18

4. Во всплывшем окне кликнуть по папке «Открыть» (рисунок 19).

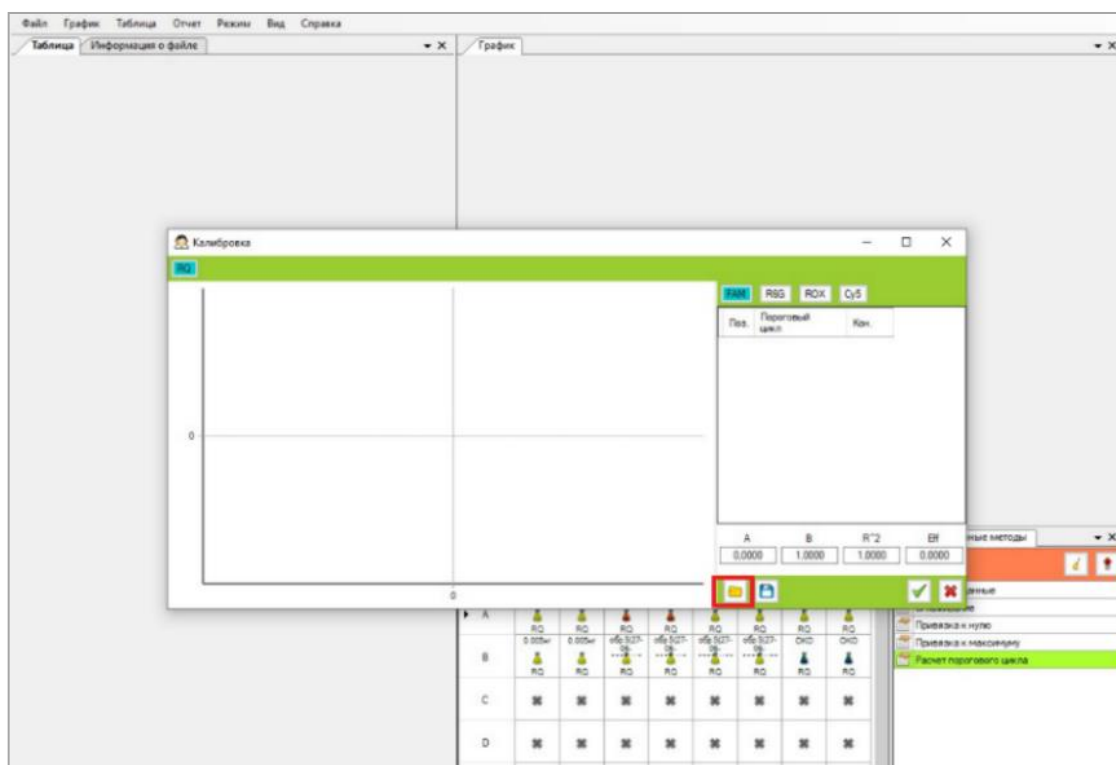


Рисунок 19

- В окне с файлами калибровок выбрать необходимый файл и нажать «Открыть» (рисунок 20). После этого калибровка будет применена к анализируемому файлу с исследуемыми образцами.

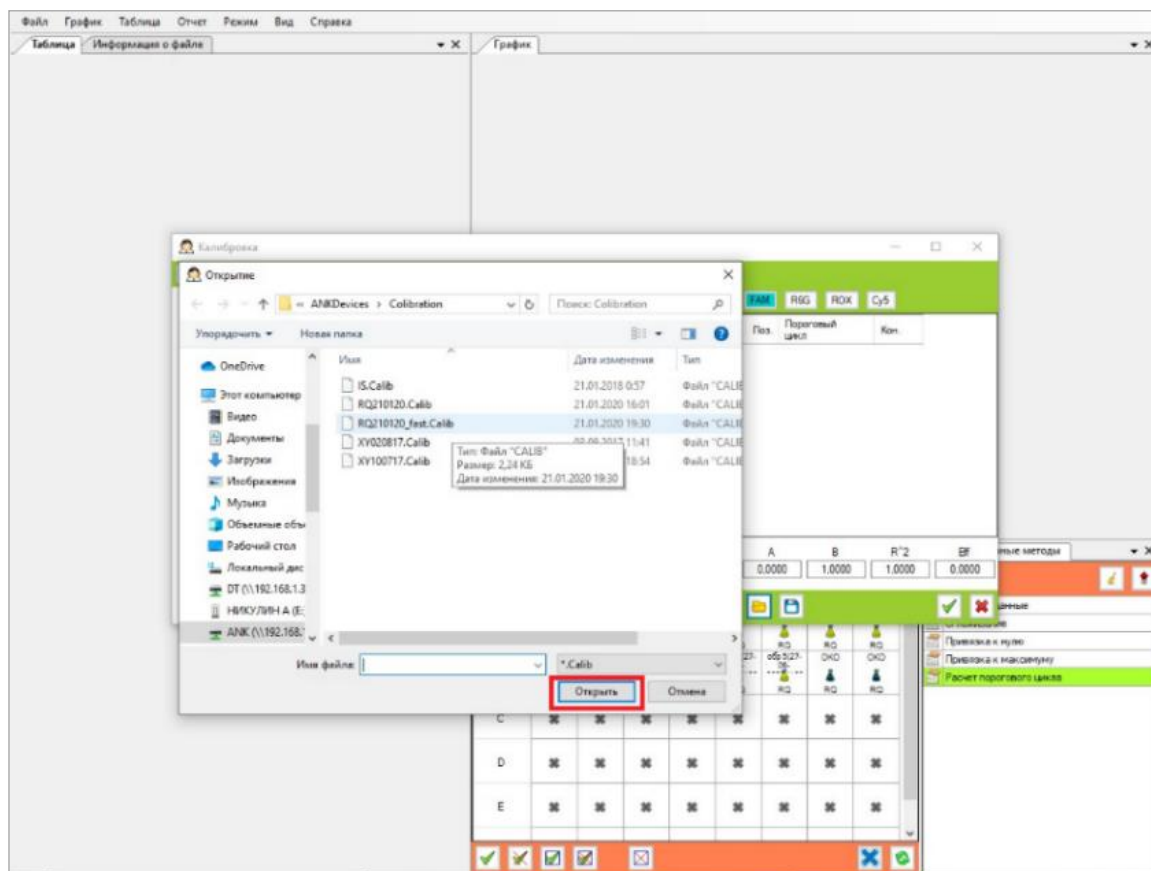


Рисунок 20

6. Далее открыть вкладку «Файл» в левом верхнем углу и выбрать пункт «Сохранить как шаблон» (рисунок 21).

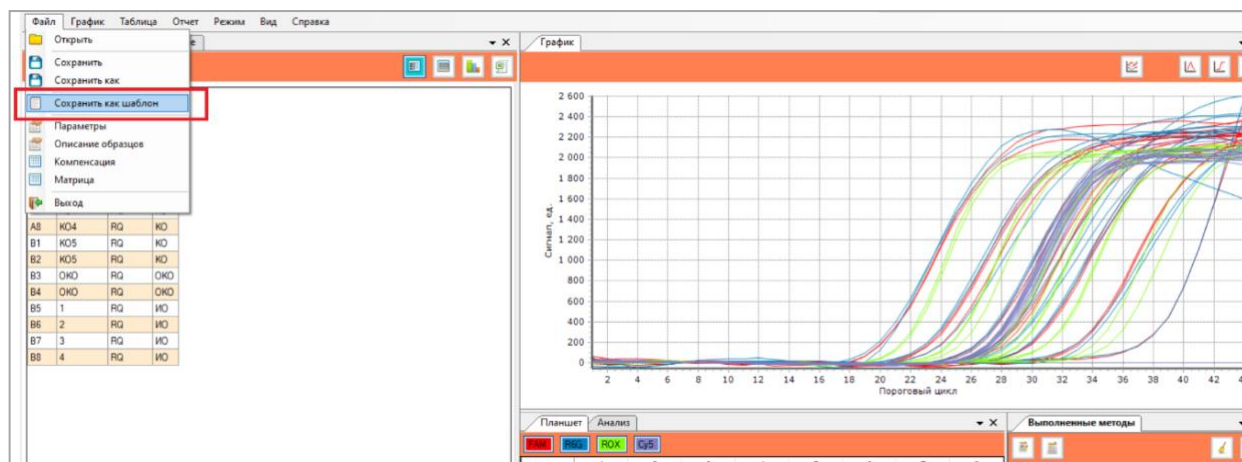


Рисунок 21

7. В окне с шаблонами выбрать **RQ-test** или **RQ-F-test** (в зависимости от типа шаблона, который был выбран в п.1) и нажать «Сохранить» (рисунок 22). Файл шаблона сохранится с использованием выбранной внутренней калибровки.

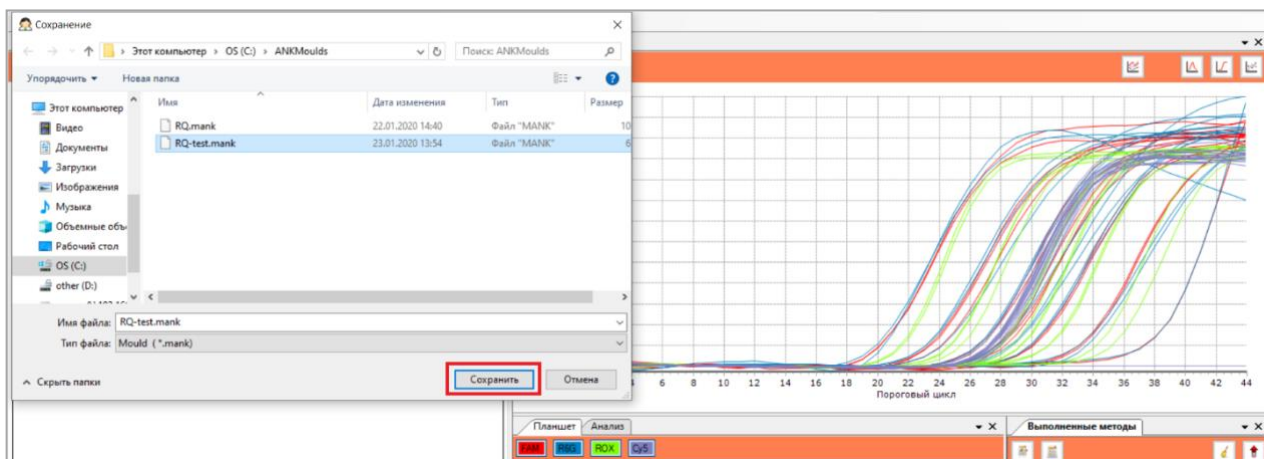


Рисунок 22

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

Примечание - При получении новой серии наборов необходимо получить новую калибровочную кривую в соответствии с пп. 7.1.2, 7.1.3.

7.2. Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе CFX96

ВАЖНО! Проведение ПЦР-РВ-анализа с помощью набора «RealQuant H3» на приборе CFX96 возможно только с получением калибровочной кривой при каждой постановке.

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации.
2. Запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
3. В меню **File** выбрать **New**→**Protocol**. В появившемся окне задать циклограмму со следующими параметрами:

Sample Volume 22 µl

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

5. GOTO 2, 44

END

Нажать **OK** и сохранить протокол на компьютере в удобной рабочей папке.

4. Для внесения сведений об образцах и красителях во вкладке **Plate** выбрать опцию **Create New**. Курсором выделить поле с лунками, в которых установлены пробирки, и в графе **SampleType** временно обозначить все занятые лунки как **Unknown**, выбрав в правом верхнем углу соответствующую строчку **Unknown**.
5. Нажать кнопку **Select Fluorophores** (рисунок 23). В появившемся окне выбрать красители **FAM**, **HEX**, **ROX**, **Cy5**. Нажать **OK**. Задать измерение сигнала во всех пробирках по выбранным красителям: поставить «галочки» в колонке **Load** напротив названий всех выбранных красителей.

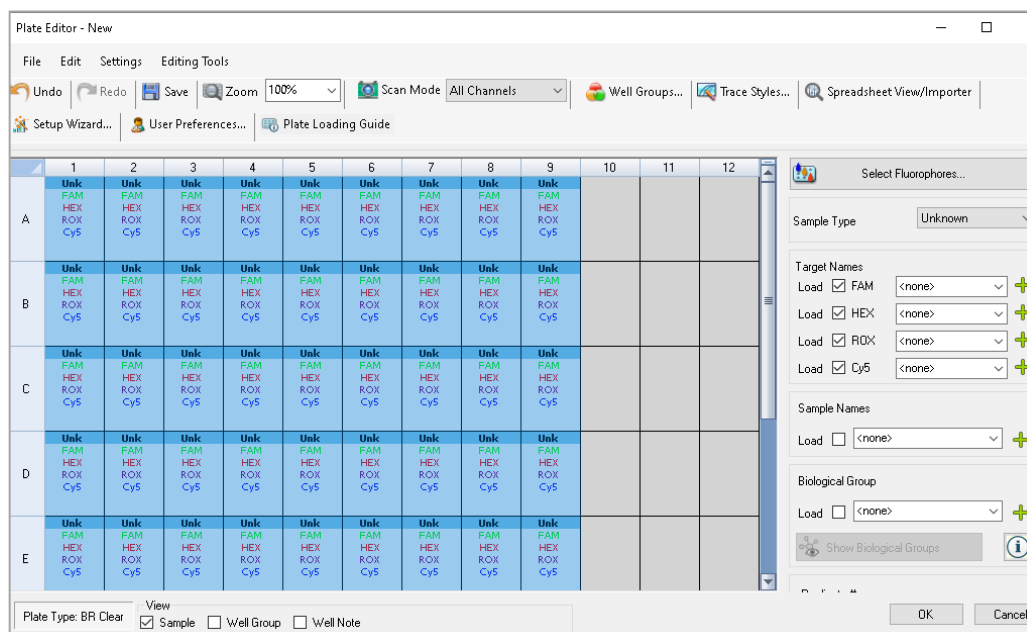


Рисунок 23

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

- Лунки с A1 по E1 и с A2 по E2 – калибровочные образцы **КО**. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с КО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Standard**. Обязательно задать концентрацию каждого калибровочного образца, для чего выделить A1-2 лунки, куда внесен **КО1**, в графе **Concentration** вписать концентрацию **КО1** – 50, повторить то же самое для **КО2** – 5, **КО3** – 0,5, **КО4** – 0,05, **КО5** – 0,005.
- Лунки F1, F2 – **ОКО**. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с ОКО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Negative Control**.
- Следующие лунки – исследуемые образцы в соответствии с порядком внесения образцов. Выбранный тип образца в графе **Sample Type** – **Unknown**. Задать названия всех исследуемых образцов. Выделить лунки, в которых находятся пробирки с обозначаемым образцом, и в графе **Sample Name** ввести (или выбрать из уже имеющихся) имя соответствующего образца, затем поставить «галочку» в соседней графе **Load** или нажать клавишу **Enter** (рисунок 24). Повторить то же самое для оставшихся образцов.

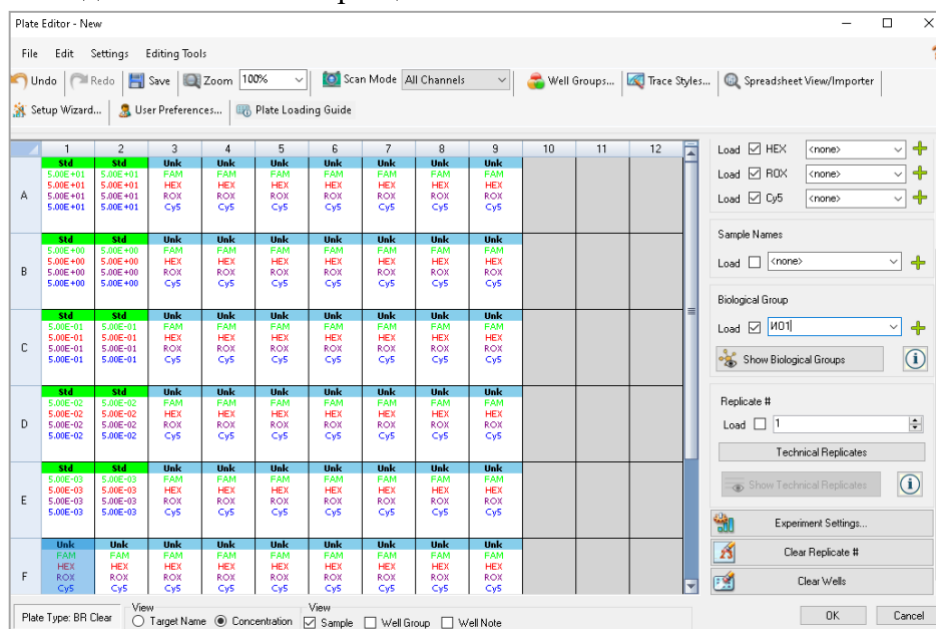


Рисунок 24

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

7.3. Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТпрайм II»

7.3.1. Программное обеспечение DTmaster

ВАЖНО! При первом запуске приборе линейки «ДТ» и при изменении типа пластика проводится измерение высоты пробирок.

1. Установить пластик соответствующего типа в прибор.
2. Открыть программу **DTmaster**.
3. Перейти во вкладку «**Запуск**», справа от строки «**Прибор отсутствует**» нажать на иконку папки и в открывшемся окне выбрать прибор, нажать «**Подключить**» (рисунок 25).

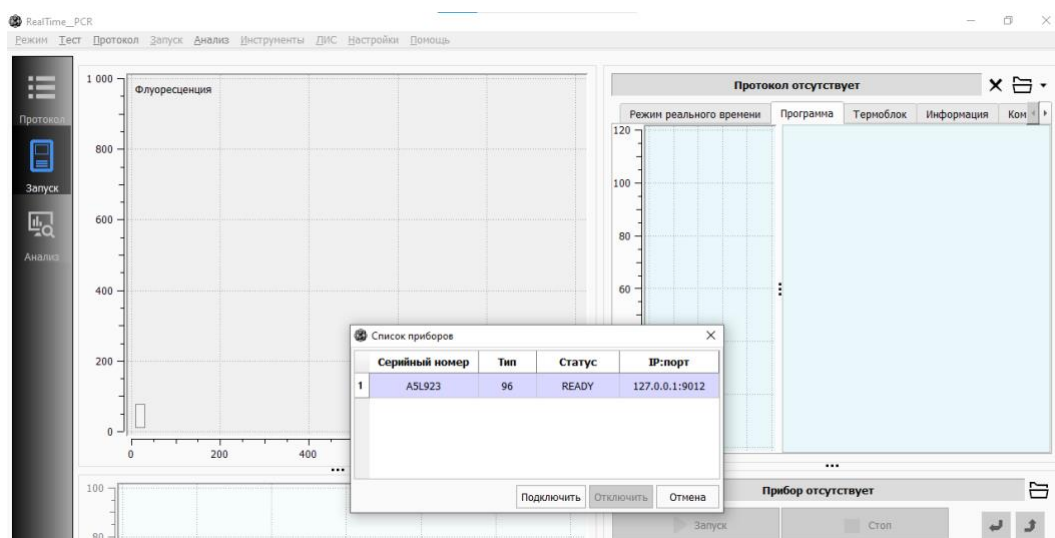


Рисунок 25

4. На вкладке «**Настройки**» под названием прибора нажать «**Измерение высоты пробирки**» (рисунок 26).

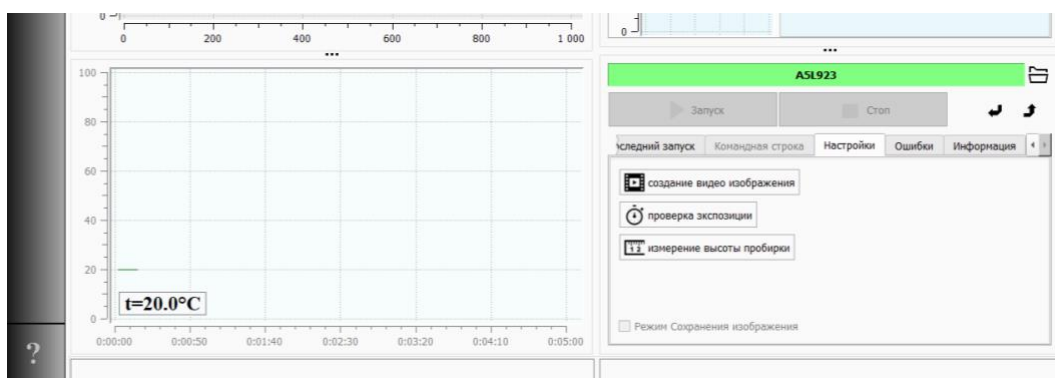


Рисунок 26

5. После успешного измерения появится окно. В нем нажать «**Да**», затем «**ОК**» (рисунок 27).

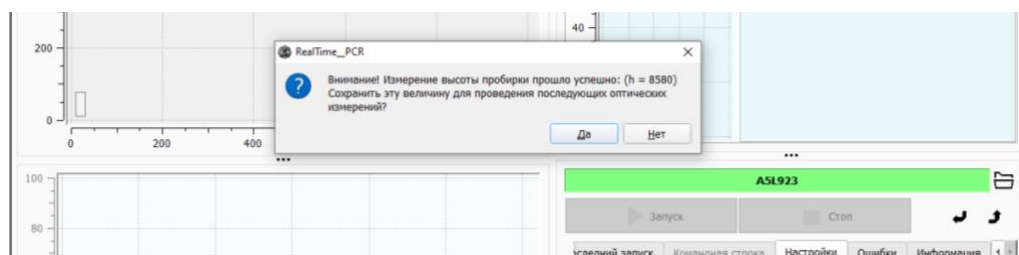


Рисунок 27

6. В случае если измерение не прошло, повторить его до получения положительного результата.

7.3.2. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3

1. Открыть программу **DTmaster**.
2. Во вкладке «**Запуск**» убедиться, что прибор подключен.
3. В нижнем левом углу монитора нажать иконку «**Добавить образцы/Тесты**» (рисунок 28).

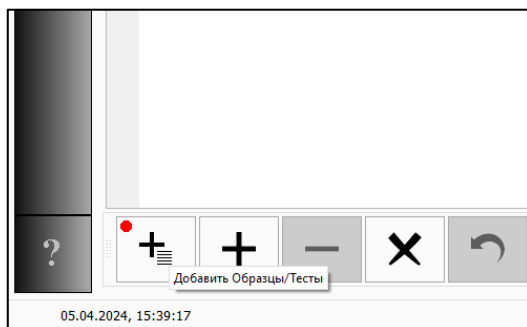


Рисунок 28

4. В открывшемся окне во вкладке «**Тест**» раскрыть список тестов, выбрать раздел «**Криминалистика**», в нем «**RealQuant H3**» (рисунок 29).

Примечание – Шаблон «RealQuant H3» предоставляется производителем набора.

5. Указать количество исследуемых образцов и их дублей (если требуется), количество К- (отрицательный контрольный образец, ОКО), количество дублей стандартов (калибровочных образцов).

Примечание - Если планируется использовать виртуальную калибровочную кривую (см. п. 7.3.3), в графе «Кол-во стандартов» необходимо указать 0. Для определения достоверности установления концентрации в проекте должен присутствовать как минимум один положительный контроль (КО2).

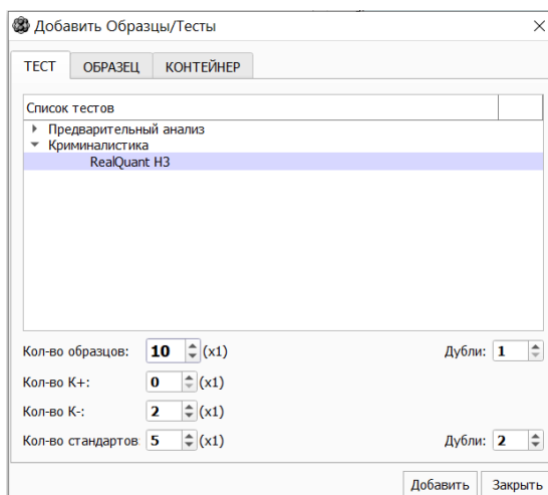


Рисунок 29

6. Нажать «**Добавить**», затем «**Заккрыть**».
7. Выделить поочередно каждый образец и контроль и разместить их в плашке, нажимая на соответствующие ячейки плашки (рисунок 30).

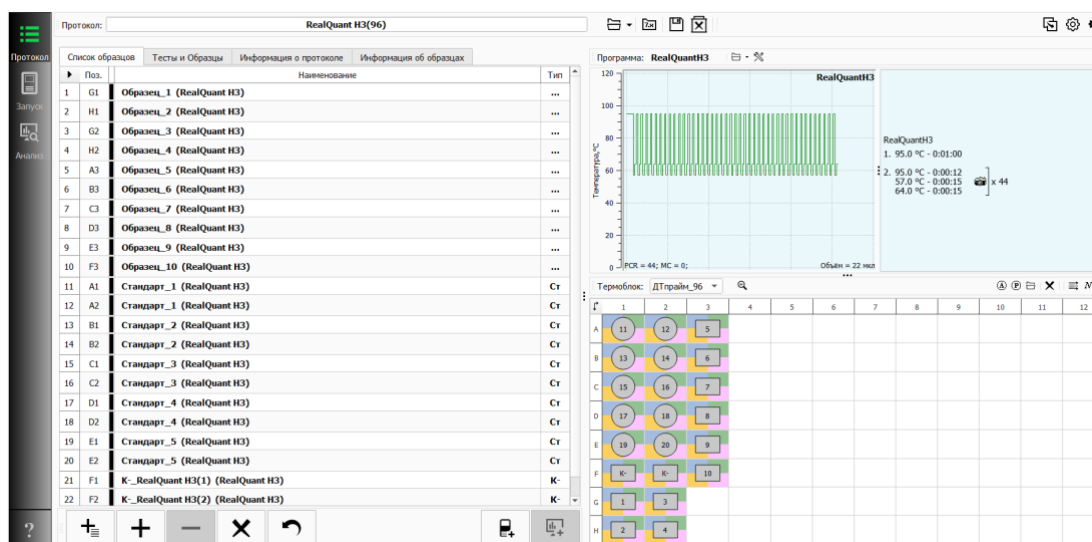


Рисунок 30

8. Нажать «Загрузить в окно Запуска» (рисунок 31).

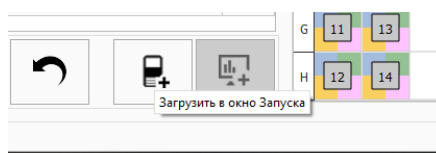


Рисунок 31

9. В окне «Запуск» нажать кнопку «Запуск» (рисунок 32).

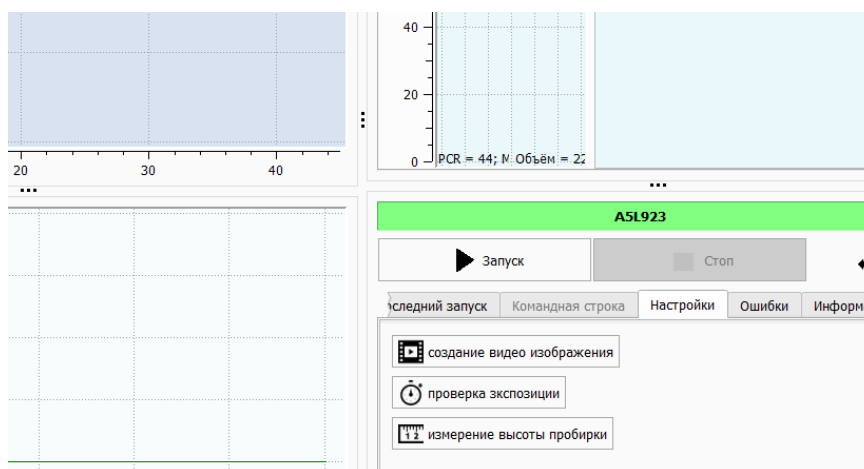


Рисунок 32

10. После завершения программы ПЦР-РВ полученный файл автоматически сохраняется на компьютере в указанной директории.

7.3.3. Настройка и использование калибровочной кривой

1. Открыть вкладку «Анализ» текущего проекта после его завершения (рисунок 33).

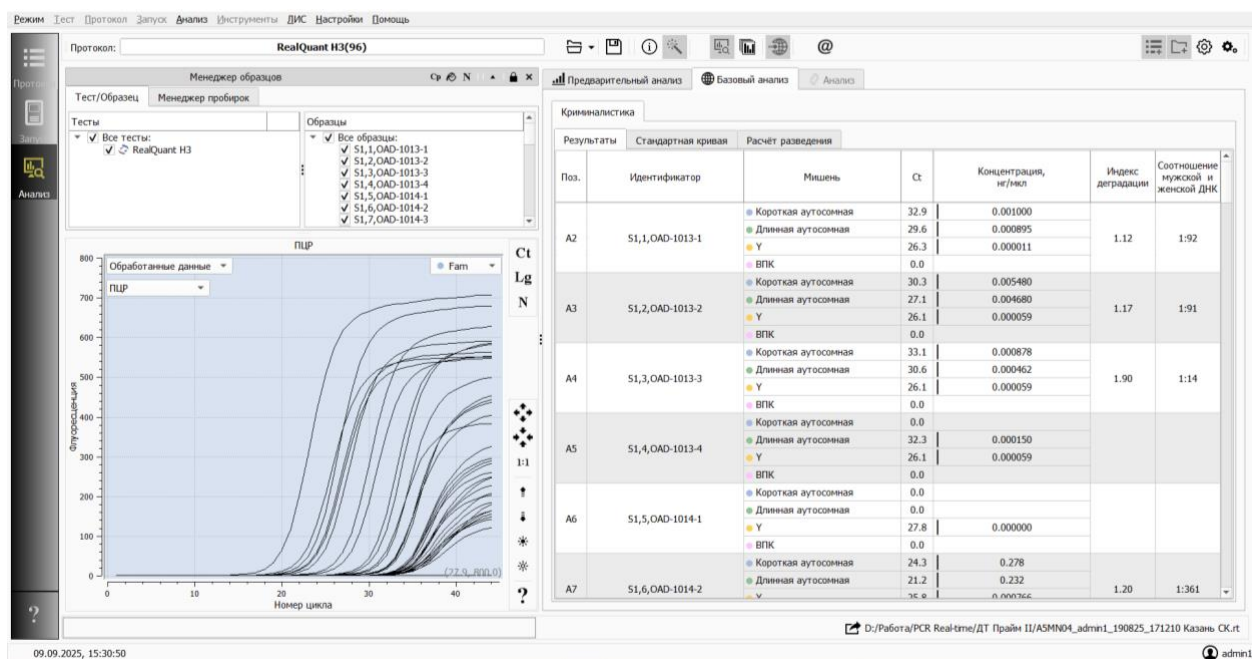


Рисунок 33

- Во вкладке «Базовый анализ» открыть вкладку «Стандартная кривая», выбрать вкладку «Дополнительные стандарты». Нажать на значок папки справа (рисунок 34).

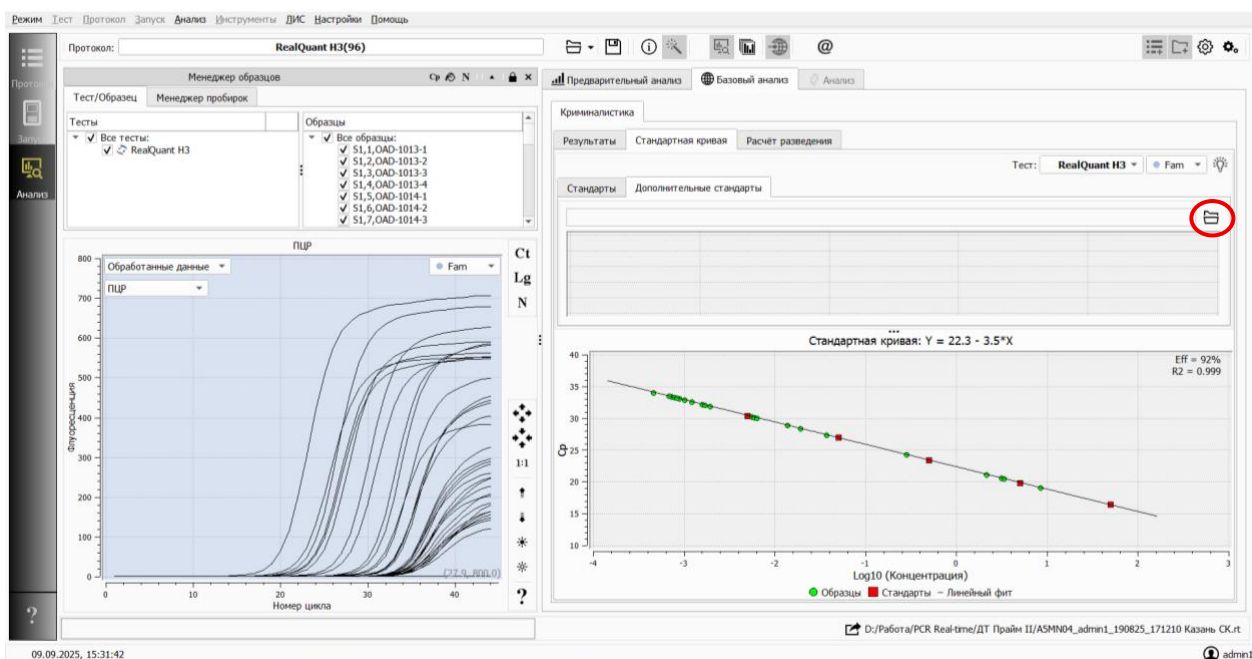
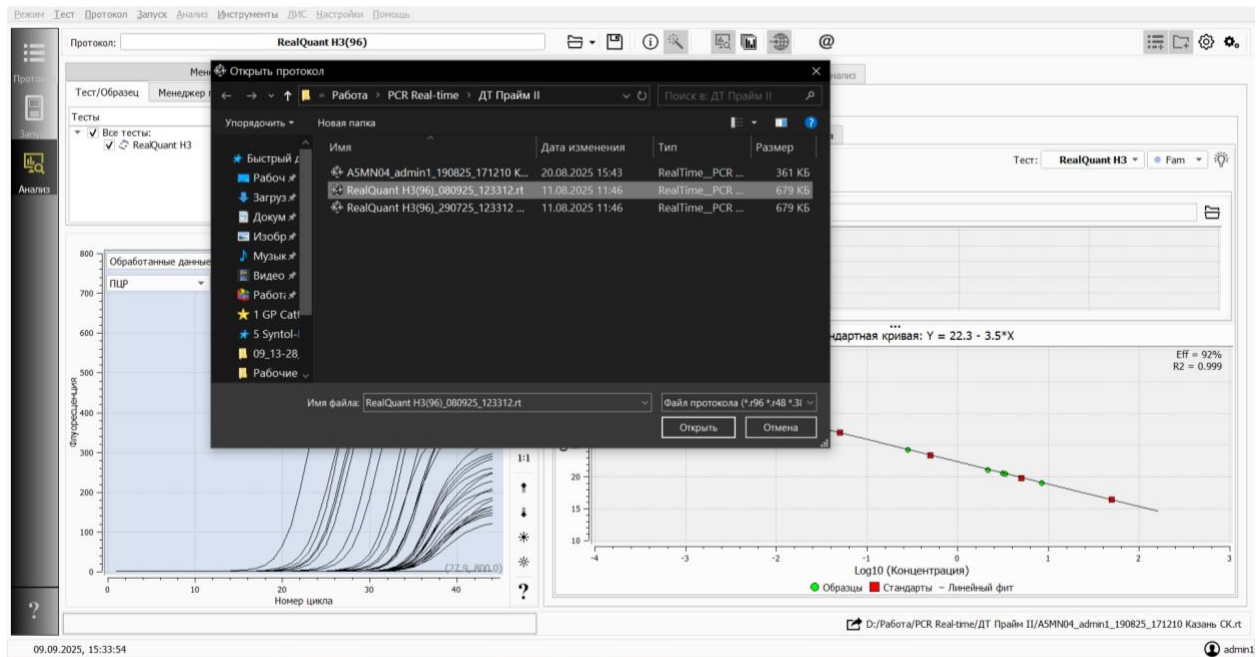


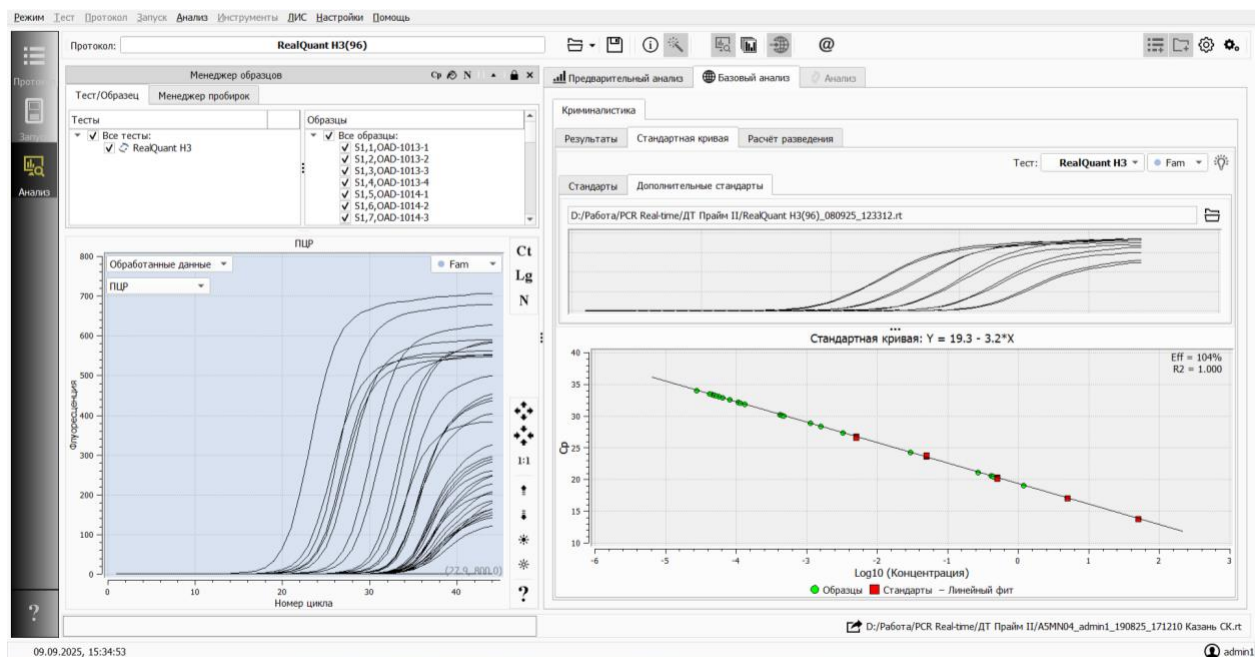
Рисунок 34

- Откроется окно проводника. В нем найти проект, из которого вы хотели бы загрузить стандарты, и открыть его (рисунок 35).

ВАЖНО! В текущий проект допускается загружать стандарты только из проектов, полученных на наборах той же серии, что и текущий проект.



4. В текущий проект подгрузятся стандарты из выбранного проекта (рисунок 36).



5. Если в текущем проекте уже есть стандарты (вместо которых вы хотите загрузить виртуальную кривую), обязательно убедитесь, что во вкладке «Стандарты» снят выбор со всех стандартов, кроме загруженных (рисунок 37).

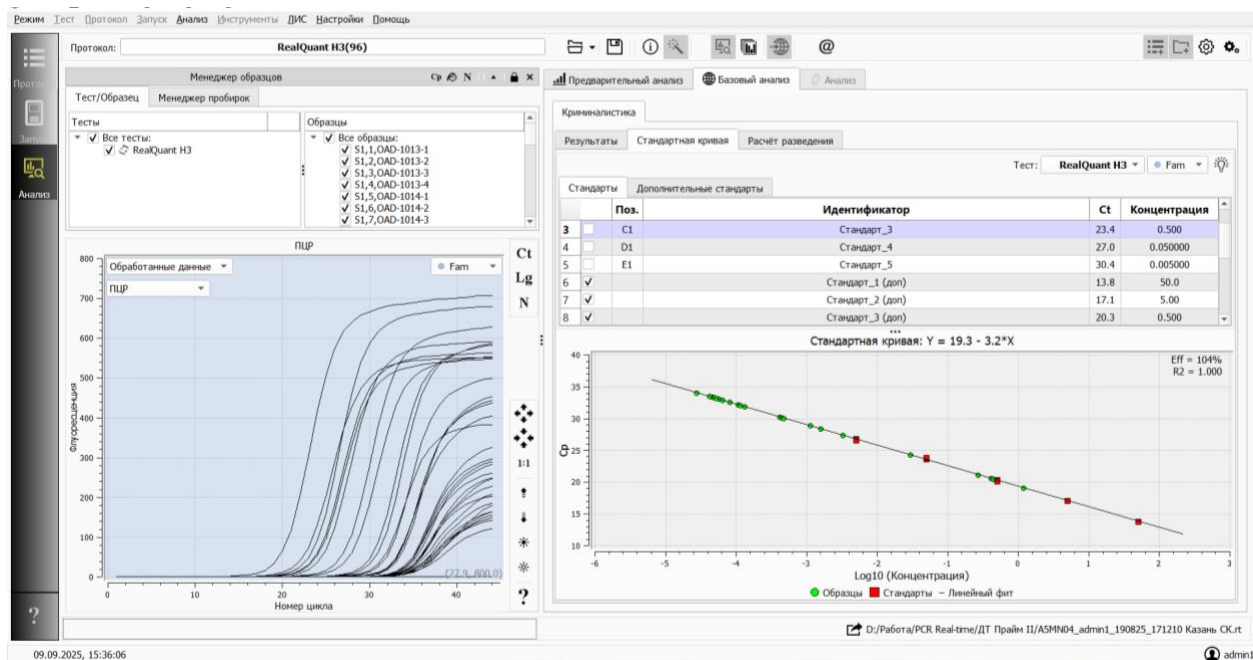


Рисунок 37

7.4. Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе Line-Gene 9660

7.4.1. Создание шаблона эксперимента

Для создания шаблона в программном обеспечении **PCR Gene-9660** необходимо:

1. Кликнуть по иконке «Относительный» в верхнем меню (рисунок 38).

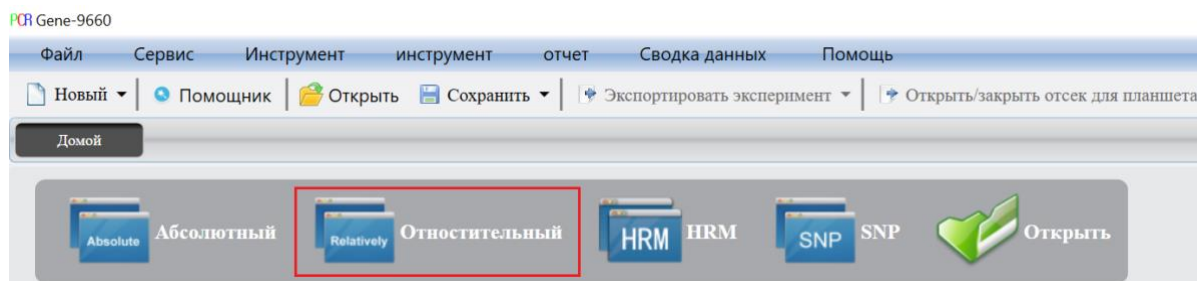


Рисунок 38

2. В открывшемся окне, в разделе «Свойства эксперимента» в графе «Имя эксперимента» указать «RealQuant H3» (рисунок 39).

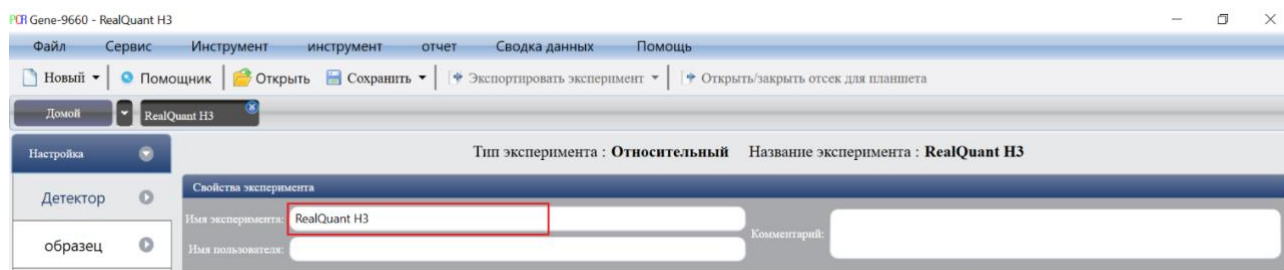


Рисунок 39

3. В разделе «Детекторы» к существующему (Задание1) добавить еще три, кликая по клавише «Добавить детектор» (рисунок 40).

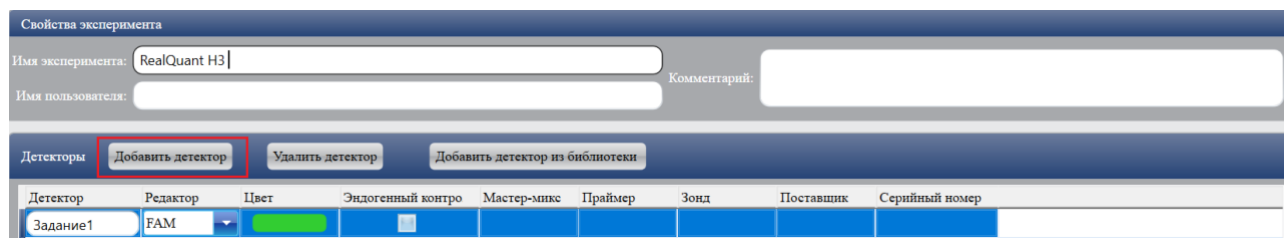


Рисунок 40

4. Назвать детекторы и выбрать для них соответствующие красители (рисунок 41).

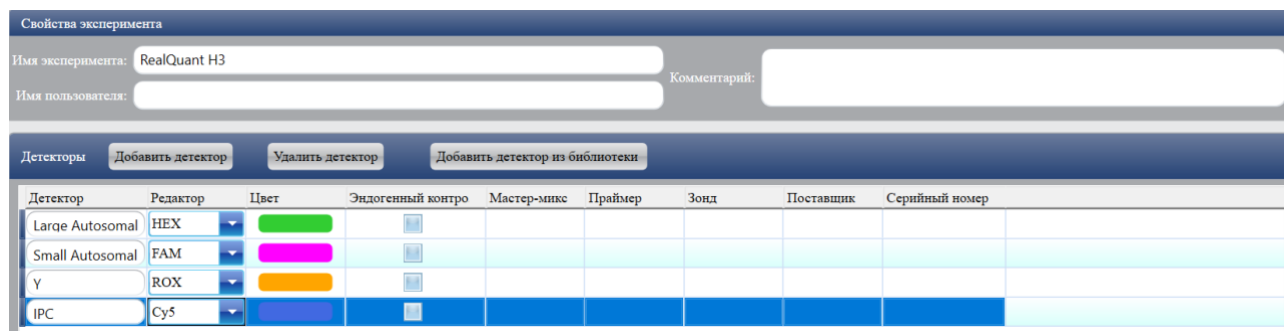


Рисунок 41

5. Перейти на вкладку «Образец» (рисунок 42) в левой верхней части монитора.

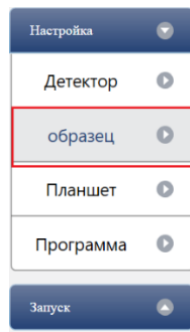


Рисунок 42

6. В открывшейся вкладке нажать клавишу «Добавить партию» (рисунок 43).

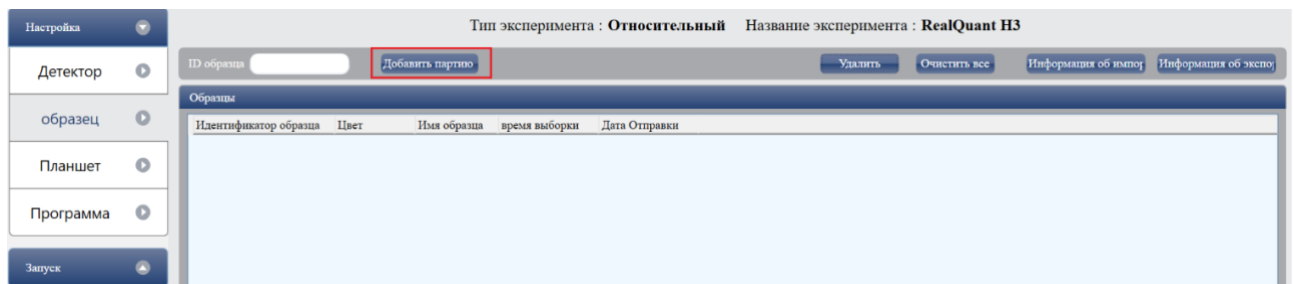


Рисунок 43

7. Во всплывшем окне в графе «Начать с Id образца» указать «st1», в графе «Количество образцов» указать – 5 (рисунок 44). Нажать кнопку «добавить».

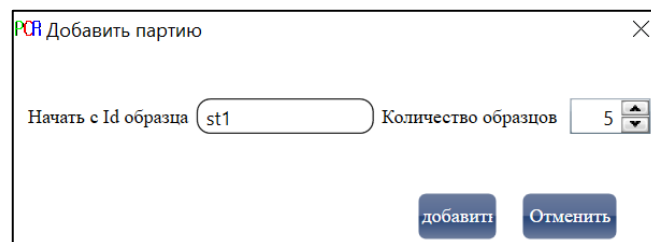


Рисунок 44

8. Заново нажать клавишу «Добавить партию». Во всплывшем окне в графе «Начать с Id образца» указать «NC», в графе «Количество образцов» указать – 1 (рисунок 45). Нажать кнопку «добавить».

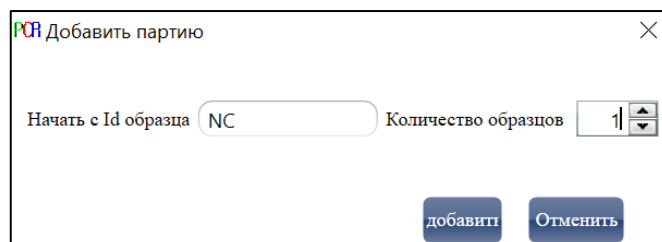


Рисунок 45

9. В столбце «Имя образца» присвоить названия согласно идентификатору образца (рисунок 46).

Образцы					
Идентификатор образца	Цвет	Имя образца	время выборки	Дата Отправки	
st1		standart1	14-09-2022	14-09-2022	
st2		standart2	14-09-2022	14-09-2022	
st3		standart3	14-09-2022	14-09-2022	
st4		standart4	14-09-2022	14-09-2022	
st5		standart5	14-09-2022	14-09-2022	
NC1		NC	14-09-2022	14-09-2022	

Рисунок 46

10. Перейти на вкладку «Планшет» (рисунок 47).

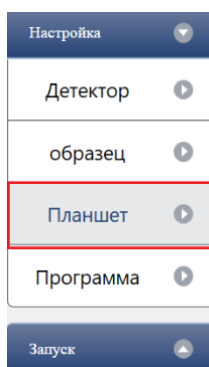


Рисунок 47

11. Расположить калибровочные образцы **St** в плашке и отметить галочками четыре заданных ранее «Детектора»: **Large Autosomal, Small Autosomal, Y, IPC** (рисунок 48).

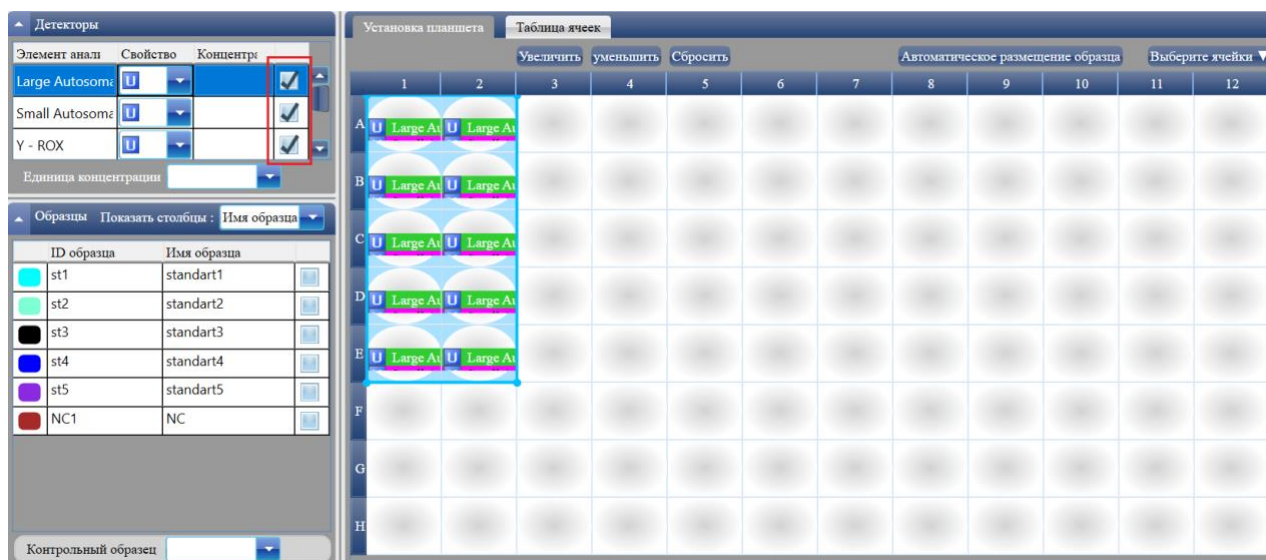


Рисунок 48

12. Отметить калибровочные образцы в графе «Свойство» как стандарты «S» по всем детекторам, кроме IPC. Для IPC – оставить «U» (рисунок 49).

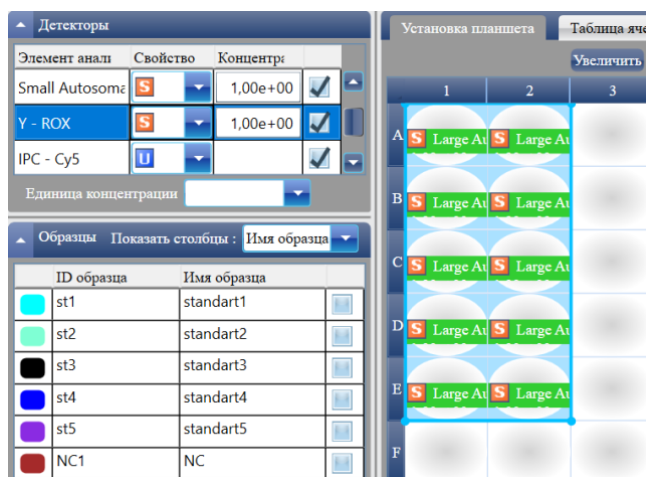


Рисунок 49

13. Во вкладке «**Установка планшета**» выделить повторы калибровочного образца **St1** (KO1), задать для них концентрацию **50** в графе «**Концентрация**», поставить галочку во вкладке «**Образцы**» и присвоить название **Standart1** в графе «**Имя образца**» (рисунок 50).

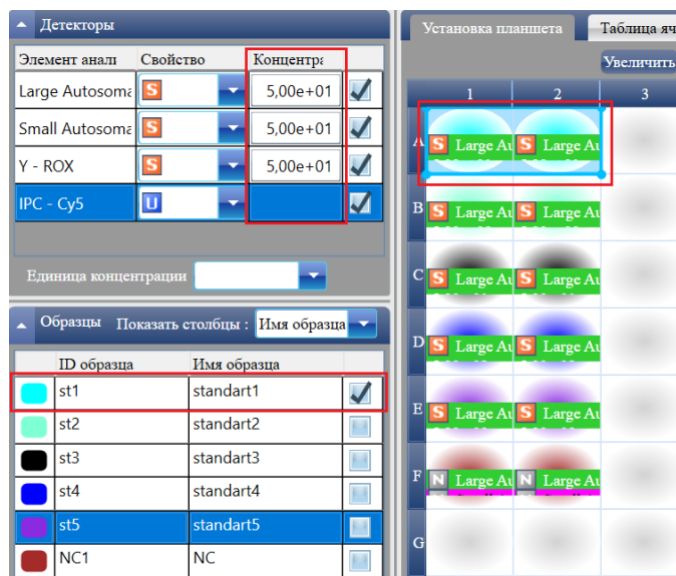


Рисунок 50

14. Аналогично выбрать повторы остальных калибровочных образцов **St2-St5** (KO2-KO5), задать для них концентрации в следующем порядке: 5; 0,5; 0,05; 0,005 и присвоить следующие названия:

St2	Standart 2
St3	Standart 3
St4	Standart 4
St5	Standart 5

15. Под калибровочными образцами **St** отметить повторы отрицательного контрольного образца ПЦР – **N**. Присвоить им название **NC** (рисунок 51).

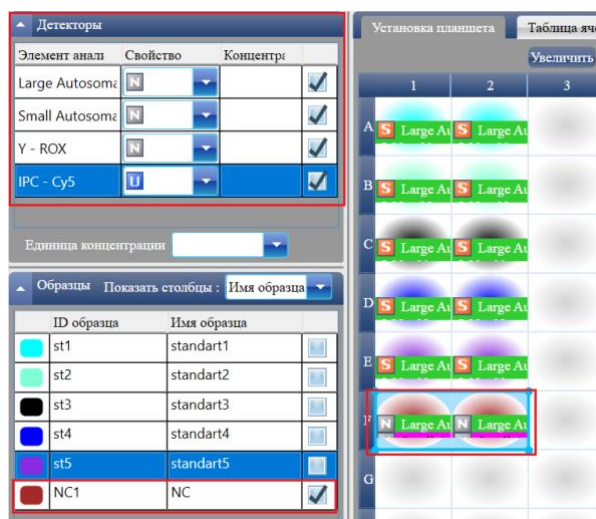


Рисунок 51

16. Выделить оставшиеся лунки плашки и выбрать U (исследуемые образцы) по всем детекторам в графе «Свойство» (рисунок 52).

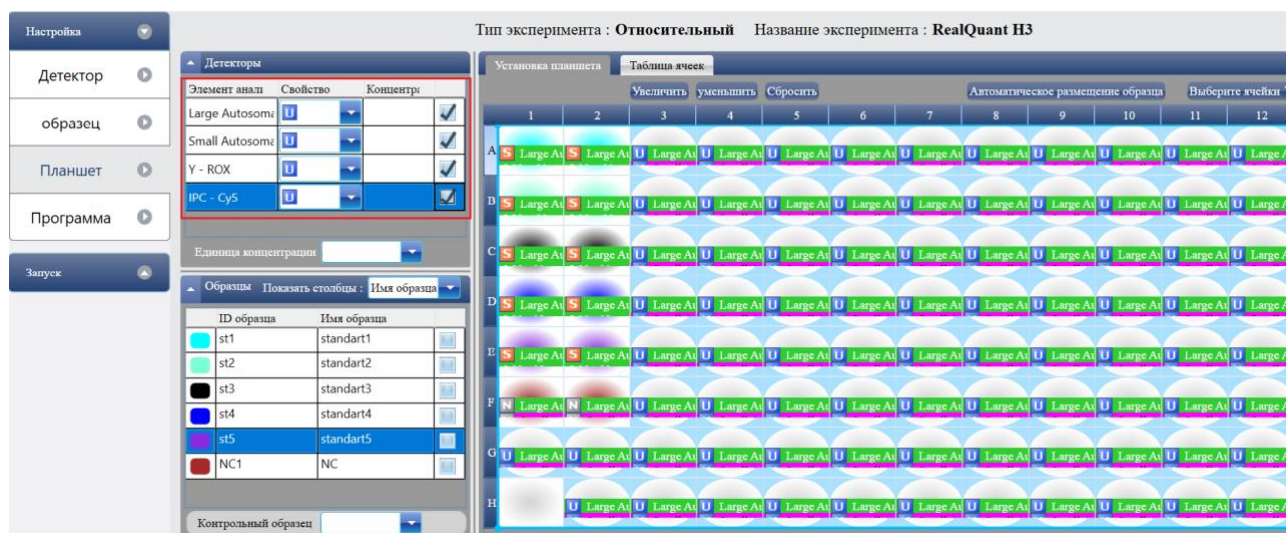


Рисунок 52

17. Перейти на вкладку «Программа» (рисунок 53).

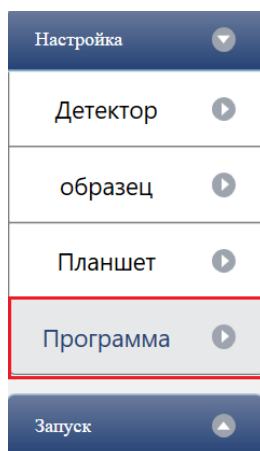


Рисунок 53

18. Установить следующие параметры ПЦР (рисунок 54):

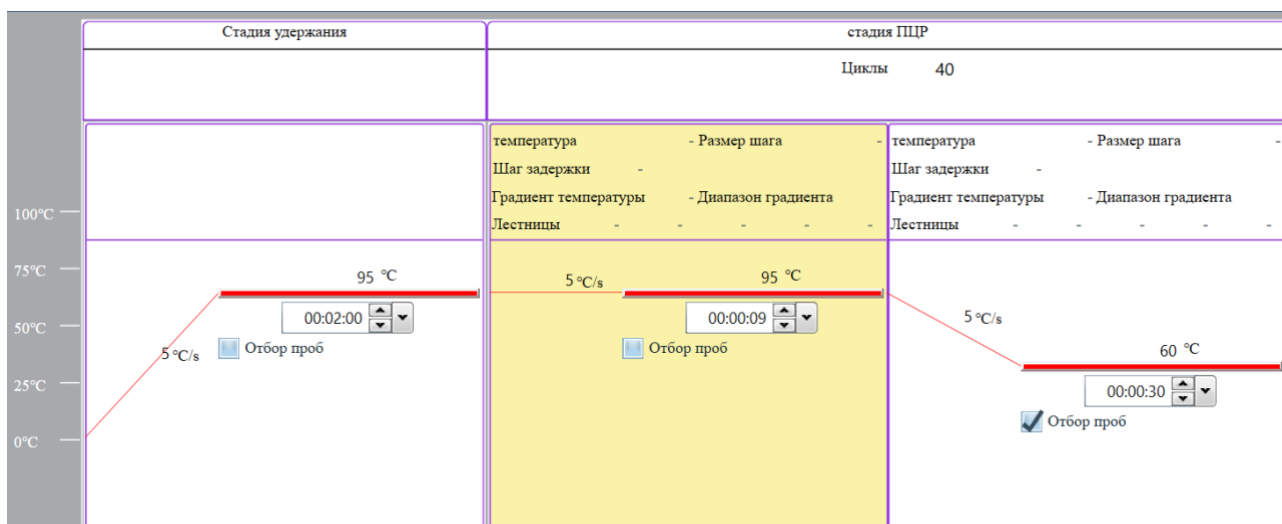


Рисунок 54

19. Кликнуть по иконке «Сохранить» и в открывшемся списке выбрать «Сохранить шаблон как» (рисунок 55).

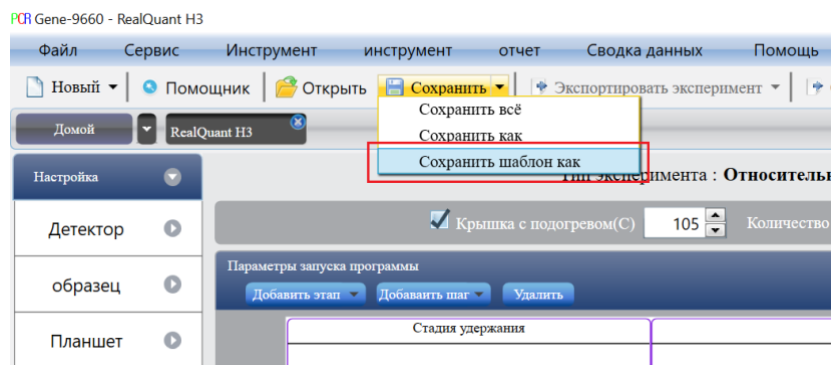


Рисунок 55

20. В появившемся окне в графе «Тип шаблона» прописать «RealQuant H3» и нажать «ОК» (рисунок 56).

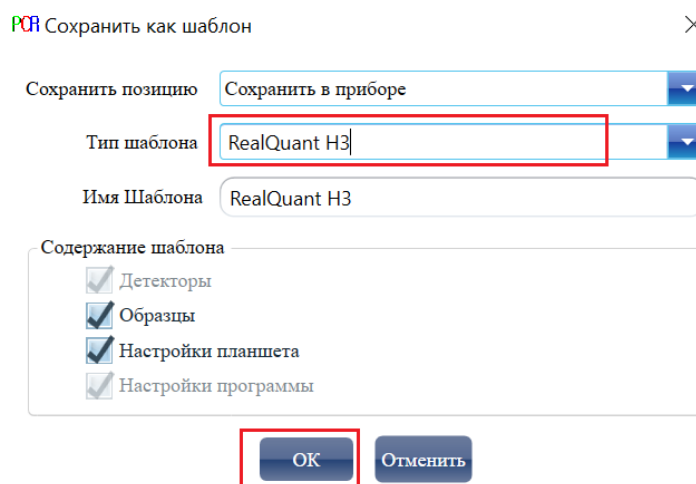


Рисунок 56

21. Созданный шаблон далее используется при проведении анализа с помощью набора «RealQuant H3».

7.4.2. Установка готового шаблона

Актуальную версию готового шаблона «RealQuant H3» можно получить по запросу от

производителя набора. Перед началом работы шаблон необходимо скопировать в папку «**templates**» программы **PCR Gene-9660**, установленной на компьютере (например, локальный диск C:/Bioer/Gene-9660/config/PCR/templates).

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

1. Открыть программное обеспечение **PCR Gene-9660**.
2. Кликнуть в правой части экрана во вкладке «**Шаблоны по категориям**» по «**RealQuant H3**» и выбрать шаблон «**RealQuant H3**» (рисунок 57).

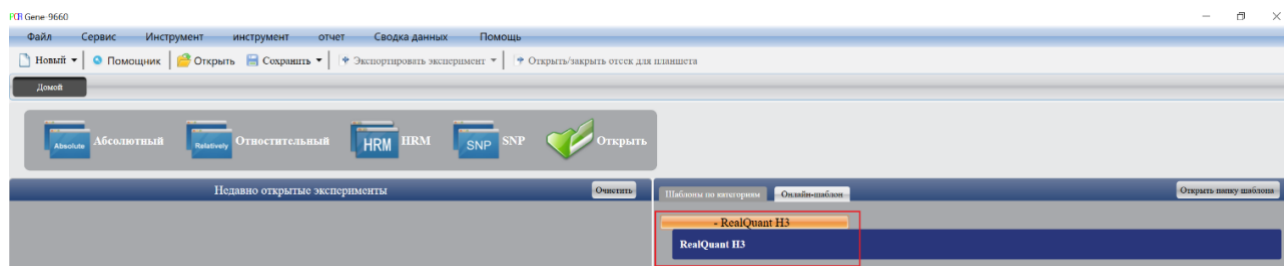


Рисунок 57

3. В открывшемся шаблоне в графе «**Имя эксперимента**» указать название. Перейти на вкладку «**Образец**» (рисунок 58).

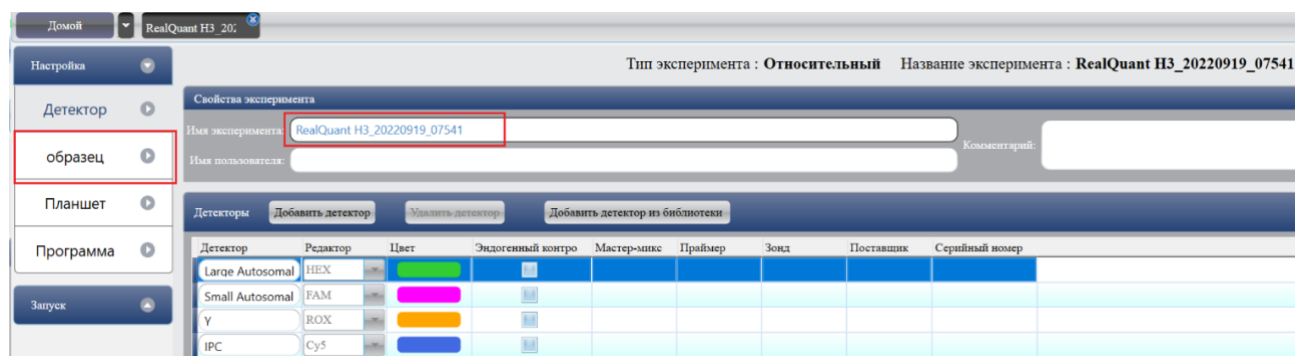


Рисунок 58

4. Нажав на клавишу «**Добавить партию**», добавить количество исследуемых образцов, указать их название (рисунок 59). Перейти на вкладку «**Планшет**».

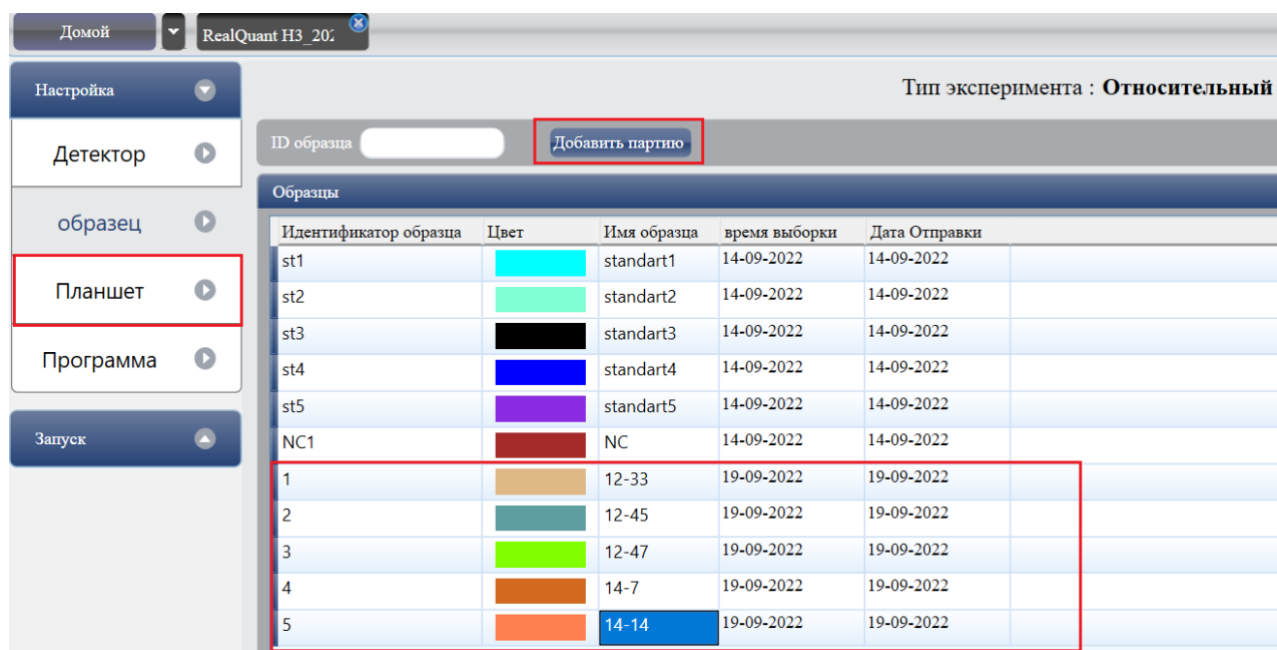


Рисунок 59

5. Отметить расположение исследуемых образцов на плашке, выделив лунки и связав с ними название образца (рисунок 60).

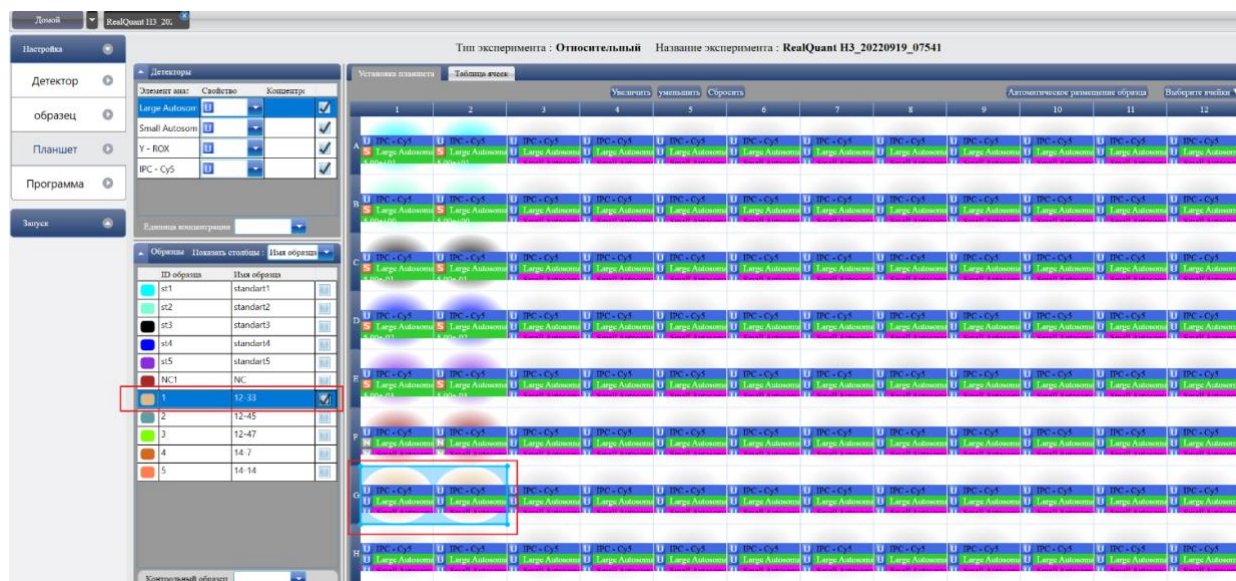


Рисунок 60

6. Очистить лунки без исследуемых образцов: выделить их, нажать правую кнопку мыши и выбрать «Очистить детекторы и образцы» (рисунок 61). Перейти на вкладку «Запуск».

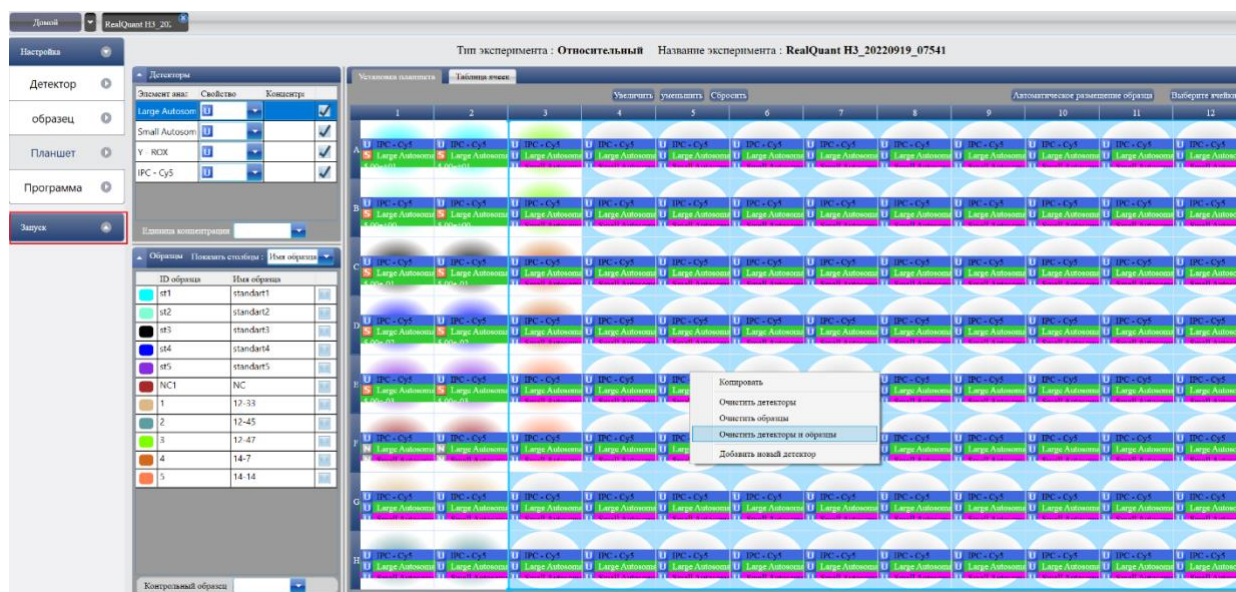


Рисунок 61

7. Нажать клавишу «Начать анализ» (рисунок 62). Прибор начнет работу.

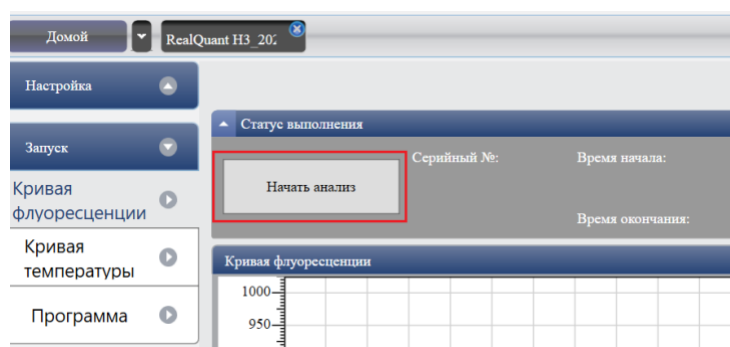


Рисунок 62

7.5. Программирование и проведение ПЦР-РВ на приборе Gentier 96/Locus Intero

7.5.1. Создание шаблона эксперимента

1. Запустить программу **Real-time PCR System**.
2. Открыть программу **Real-time PCR System**, нажать на кнопку «**File**». В открывшемся окне выбрать «**New Experiment**» (рисунок 63).

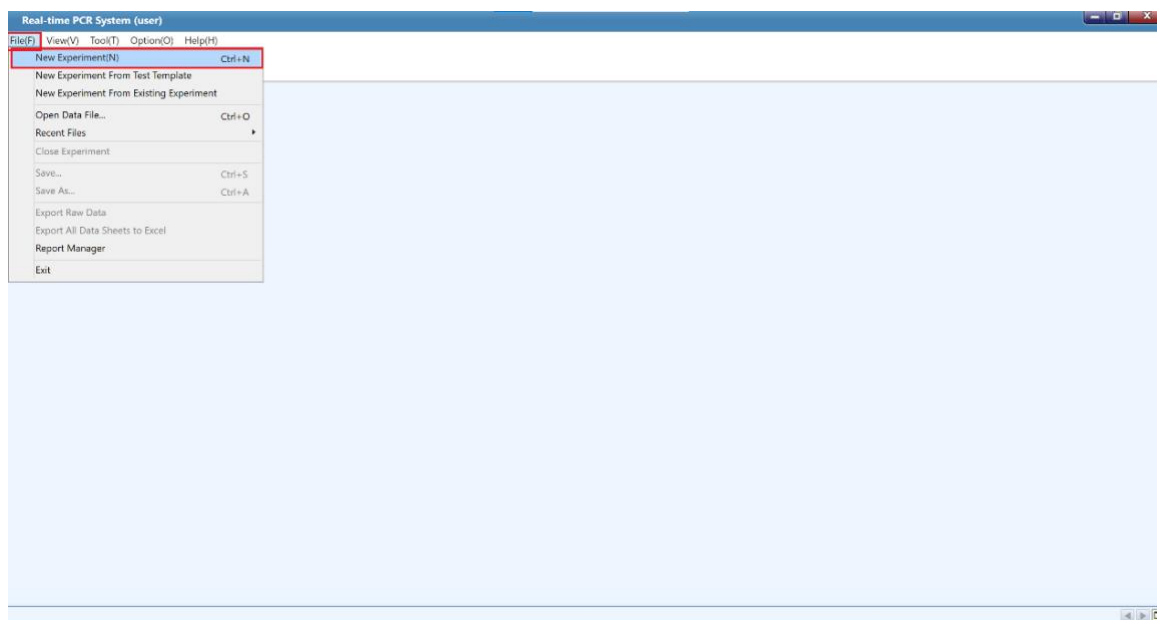


Рисунок 63

3. В открывшемся окне ввести название для шаблона «**RealQuant H3**» (рисунок 64). Указать путь до папки «**Templates**». Затем нажать кнопку «**New**».

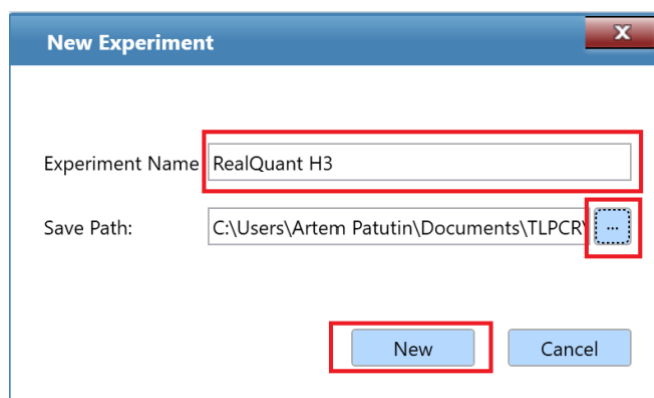


Рисунок 64

ВАЖНО! Если у вас нет папки «**Templates**», смотреть п. 7.5.2.

4. В разделе «**Run Setting**» нажать на кнопку «**Add Stage**», последовательно добавить этапы: «**Preincubation**», «**3 Step Amplification**» (рисунок 65).

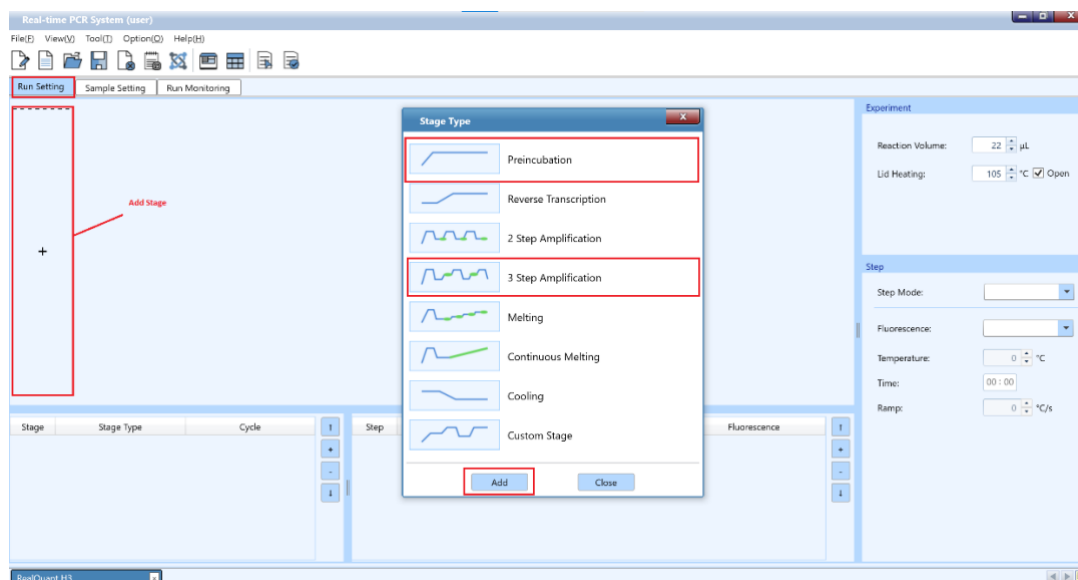


Рисунок 65

5. Выставить настройки, как показано на рисунке 66.

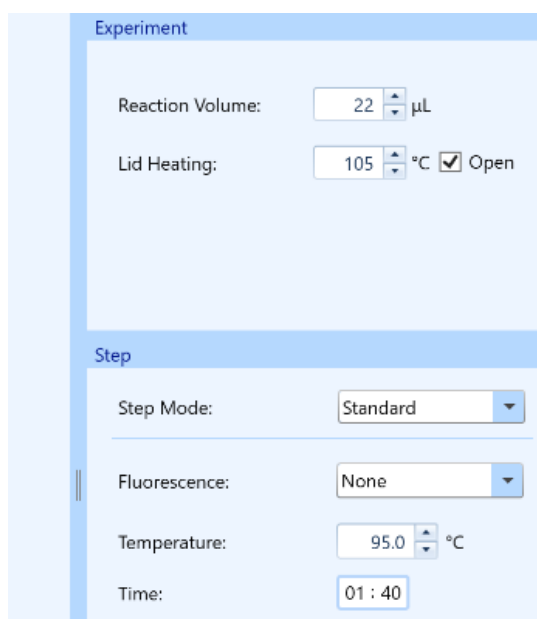
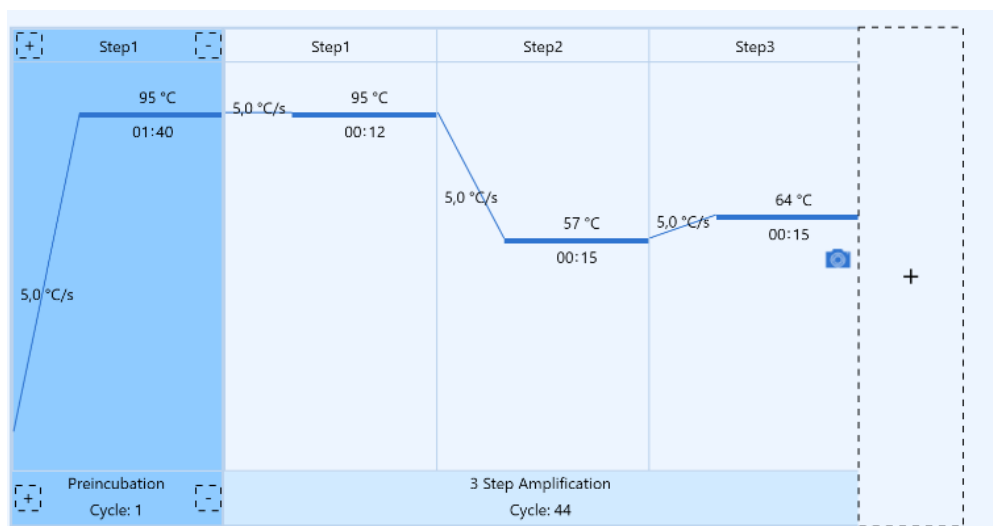


Рисунок 66

6. Перейти в раздел «**Sample Setting**». Курсором выделить поле с лунками и в графе «**Sample Type**» временно обозначить все занятые лунки как **Unknown**, выбрав в правом верхнем углу соответствующую строчку **Unknown** (рисунок 67). В разделе «**Dye**» выбрать следующие красители: **FAM, HEX, ROX, Cy5** (рисунок 67).



Рисунок 67

7. Задать сведения о калибровочных образцах (КО). Выделить лунки, в которых находятся пробирки с КО, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Standard**. Обязательно задать концентрацию каждого калибровочного образца, для чего выделить A1-A2 лунки, куда внесен **KO1**, в графе **Standard Conc.** и вписать концентрацию **KO1 – 50**. Повторить тоже самое для **KO2 – 5**, **KO3 – 0,5**, **KO4 – 0,05**, **KO5 – 0,005**. Выделить лунки F1-F2, в которых находятся пробирки с **ОКО**, и в графе **Sample Type** выбрать строчку **Negative**. Остальные образцы оставить **Unknown** (рисунок 68).

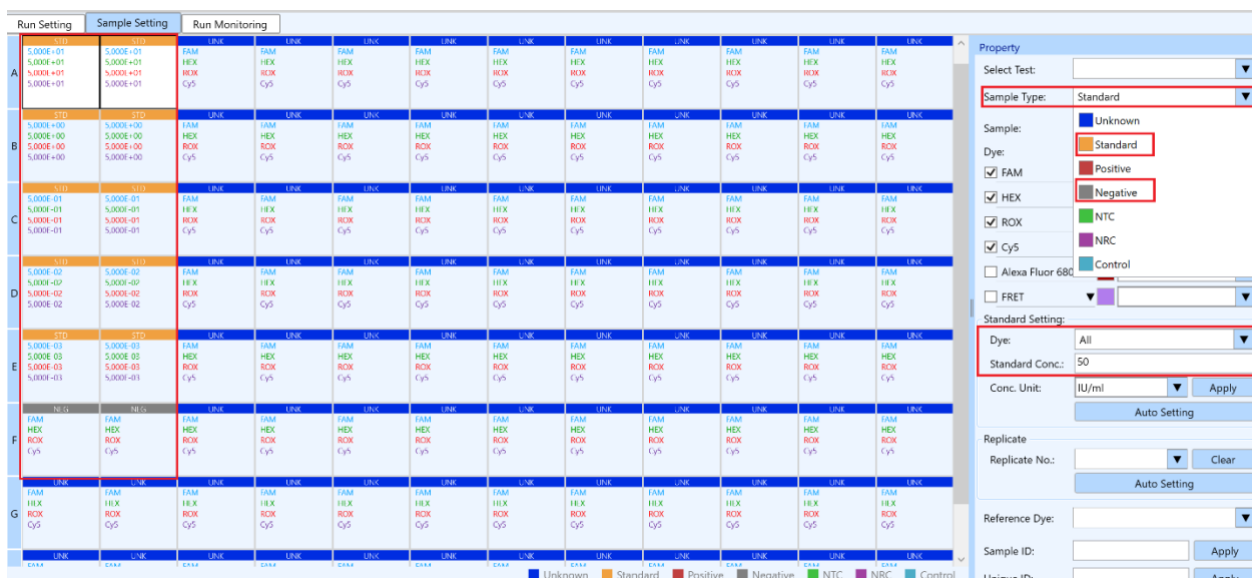


Рисунок 68

8. Нажать на вкладку «**File(F)**», выбрать «**Save as**» и сохранить шаблон в папке «**Templates**» (рисунок 69).

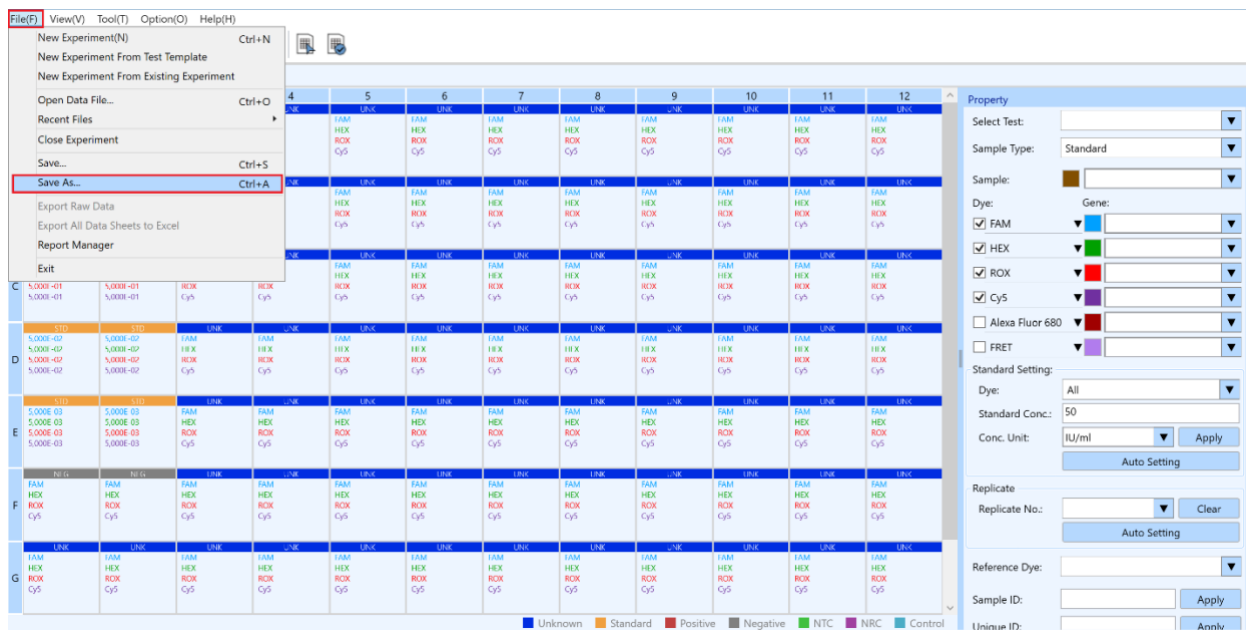


Рисунок 69

7.5.2. Установка готового шаблона

1. Актуальную версию готовых шаблонов «RealQuant H3 (Gentier 96)», «RealQuant H3 Virtual Calibration (Gentier 96)» можно получить по запросу от производителя набора.
2. Открыть папку **TLPCR** (находится в разделе «Документы (Documents)»), создать в ней папку **Templates** и вставить шаблоны «RealQuant H3 (Gentier 96)», «RealQuant H3 Virtual Calibration (Gentier 96)» (рисунок 70).

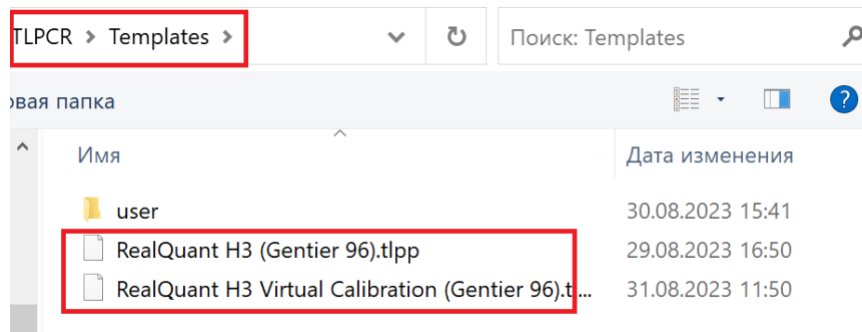


Рисунок 70

7.5.3. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона «RealQuant H3 (Gentier 96)»

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации.
2. Открыть программу **Real-time PCR System**, нажать на кнопку «File». В открывшемся окне выбрать «New Experiment from Existing Experiment» (рисунок 71).

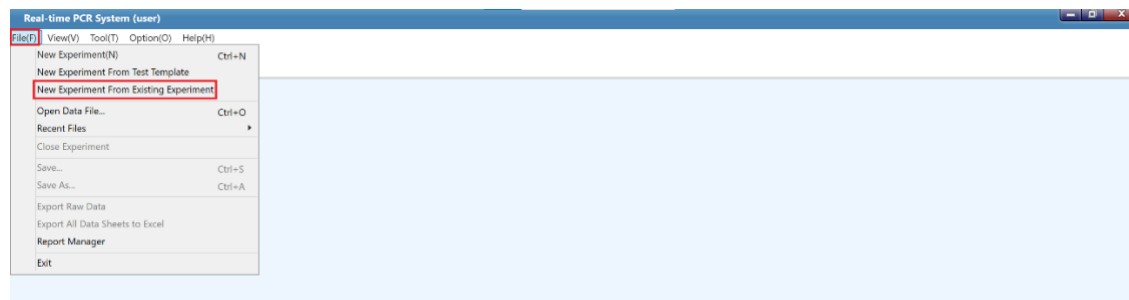


Рисунок 71

3. Открыть ранее созданную папку «**Templates**», выбрать шаблон «**RealQuant H3 (Gentier 96)**» и нажать на кнопку «**Открыть**» (рисунок 72).

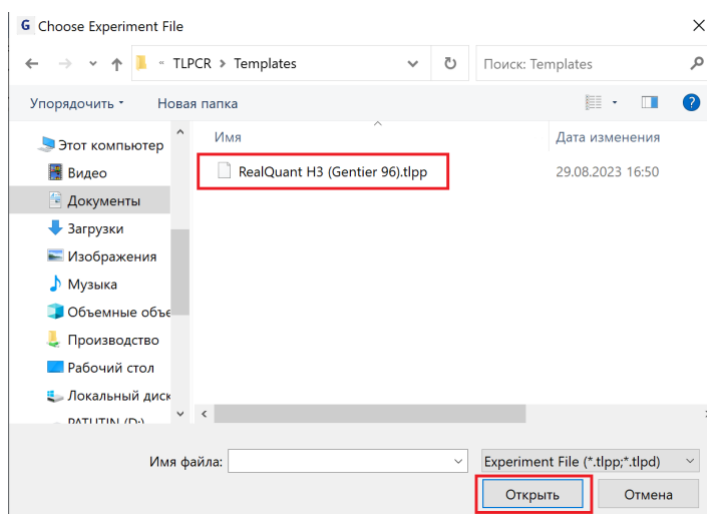


Рисунок 72

4. В открывшемся окне ввести название постановки и нажать на кнопку «**New**» (рисунок 73).

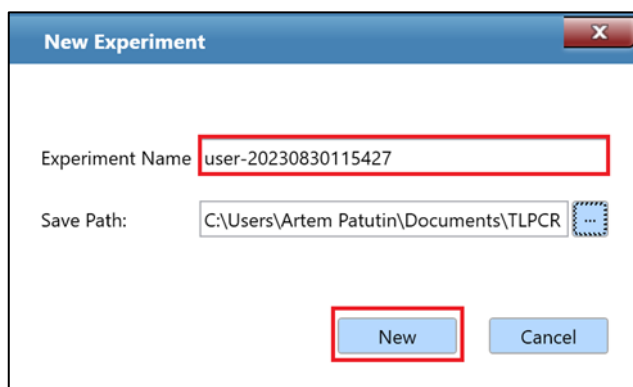


Рисунок 73

5. После открытия окна эксперимента перейти в раздел «**Sample Setting**». В данном окне оставить необходимое количество образцов, лишние удалить при помощи кнопки «**Clear Selected Wells**» (рисунок 74).

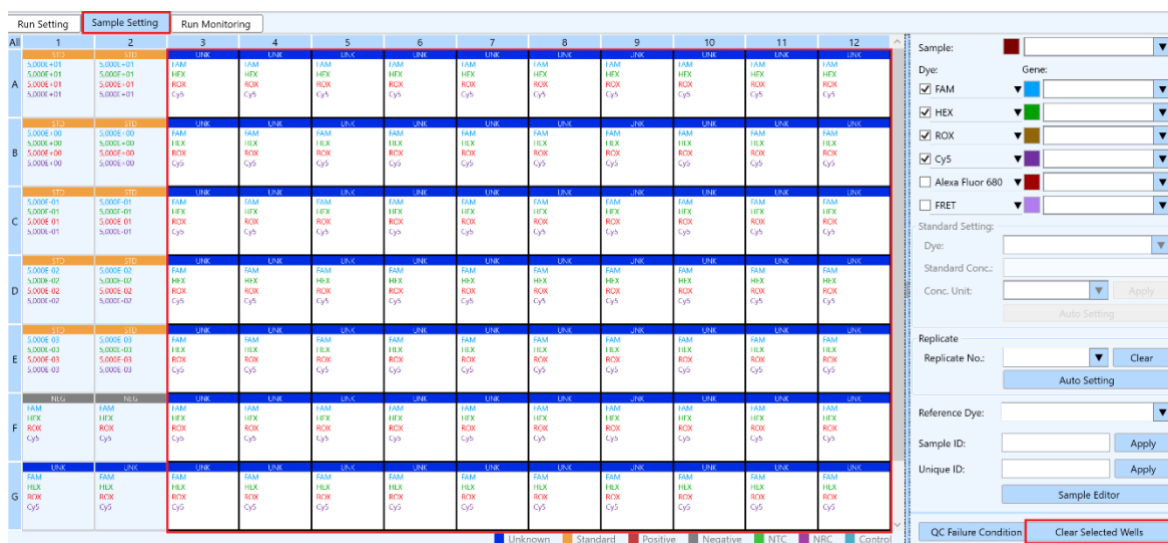


Рисунок 74

6. Для оставшихся образцов применить соответствующие названия в окне ввода «Sample» (рисунок 75).



Рисунок 75

7. Перейти в раздел «Run Monitoring» и нажать на кнопку «Run» (рисунок 76).

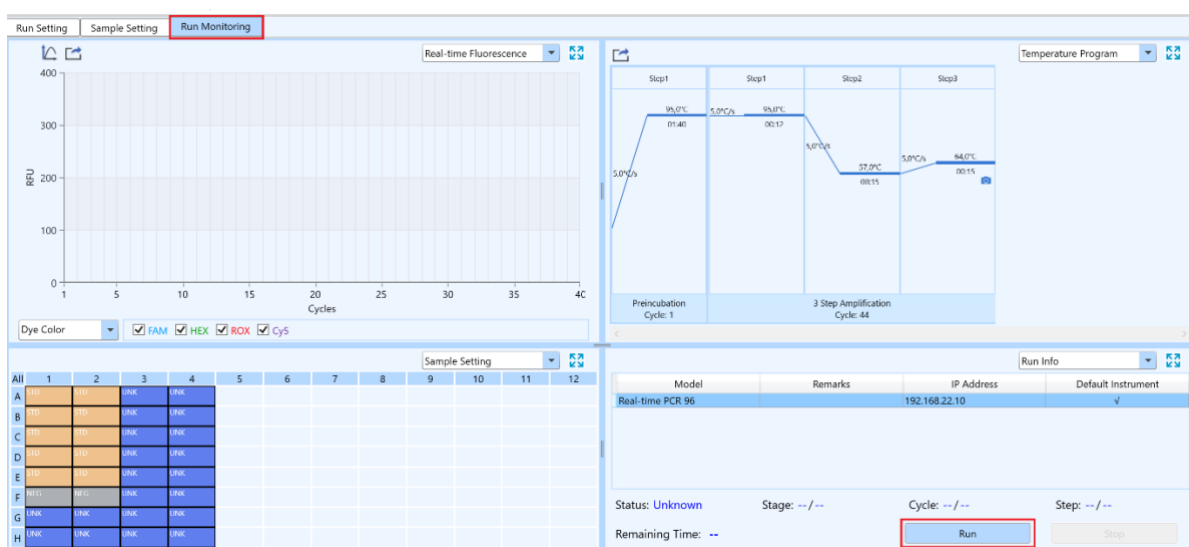


Рисунок 76

7.5.4. Создание внутренней калибровочной кривой

- Используя шаблон «RealQuant H3 (Gentier 96)», провести ПЦР-РВ с получением калибровочной кривой.
- После проведения ПЦР-РВ убедиться, что калибровочная кривая соответствует необходимым параметрам по каждому из красителей. Нужно открыть параметр «Standard Curve» в одном из окон раздела «Analysis» (рисунок 77).

Для калибровочной кривой должны выполняться все нижеперечисленные условия:

- коэффициент корреляции R^2 не ниже 0,99;
- эффективность ПЦР Efficiency составляет не менее 93 %.

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

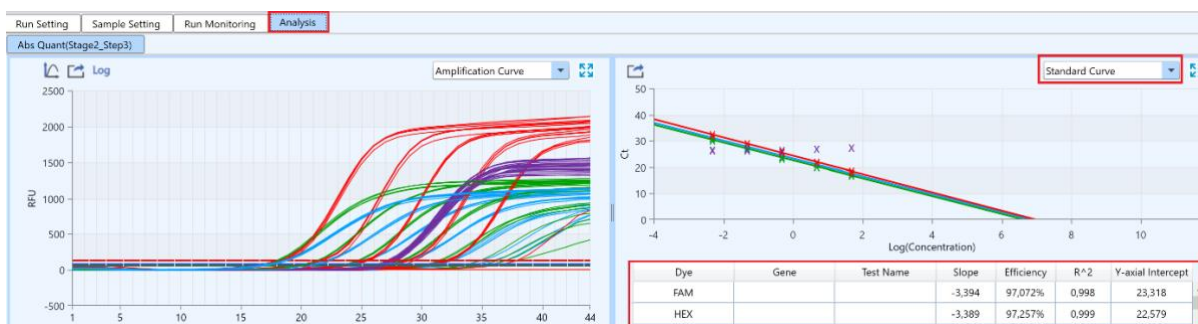


Рисунок 77

- Если значения **Efficiency** и **R²** укладываются в требуемые параметры, кликнуть по иконке «Save Std Curve» (рисунок 78).

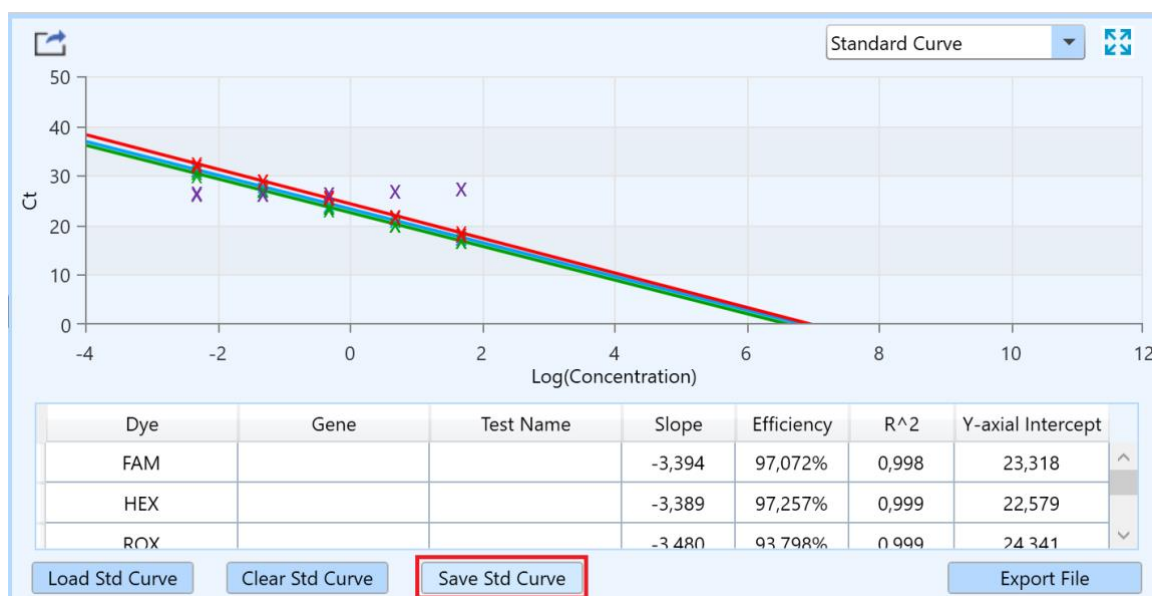


Рисунок 78

- Во всплывшем окне сохранить файл калибровки с использованием названия набора и датой получения калибровки (рисунок 79). Сохраненный файл с калибровочной кривой можно использовать для расчета концентрации ДНК в исследуемых образцах при последующих постановках ПЦР-РВ на этой серии наборов.

Рисунок 79

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 наборов.

7.5.5. Использование внутренней калибровочной кривой

- Для использования при расчете концентрации ДНК в исследуемых образцах внутренней калибровочной кривой необходимо при запуске ПЦР-РВ в программе **Real-Time PCR System** выбрать шаблон «**RealQuant H3 Virtual Calibration (Gentier 96)**».

2. Провести ПЦР-РВ, используя только ОКО (отрицательный контрольный образец) и КО2 в качестве положительного контрольного образца.
3. После прохождения ПЦР-РВ открыть файл с результатами исследования.
4. В разделе «**Analysis**» в окне «**Standard Curve**» нажать на кнопку «**Load Std Curve**» (рисунок 80).

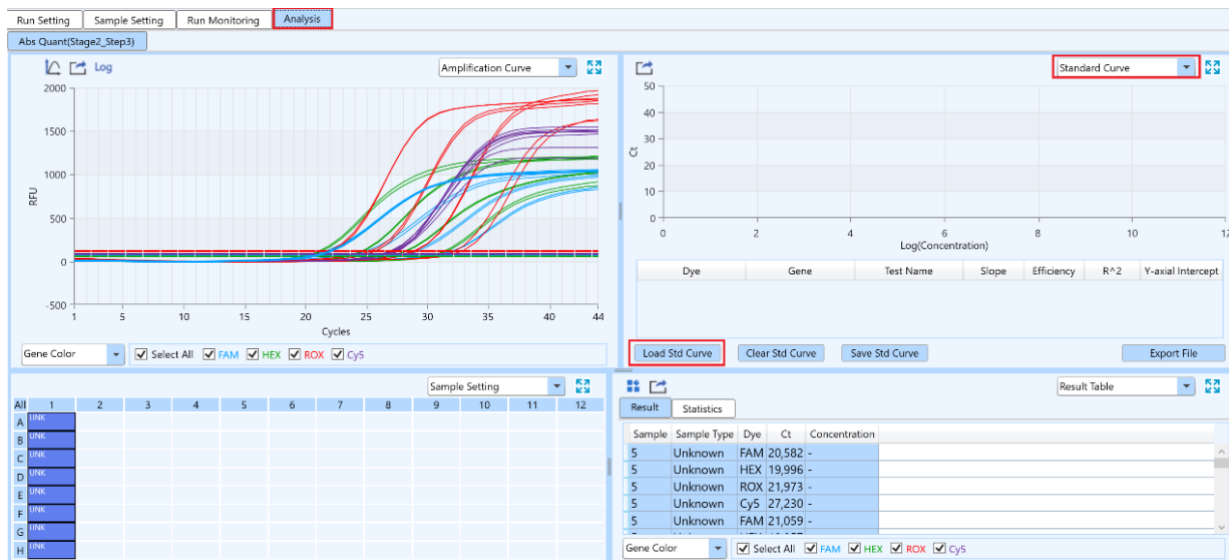


Рисунок 80

5. В открывшемся окне выбрать необходимую калибровку и включить все красители как показано на рисунке 81. Далее нажать кнопку «**ОК**».

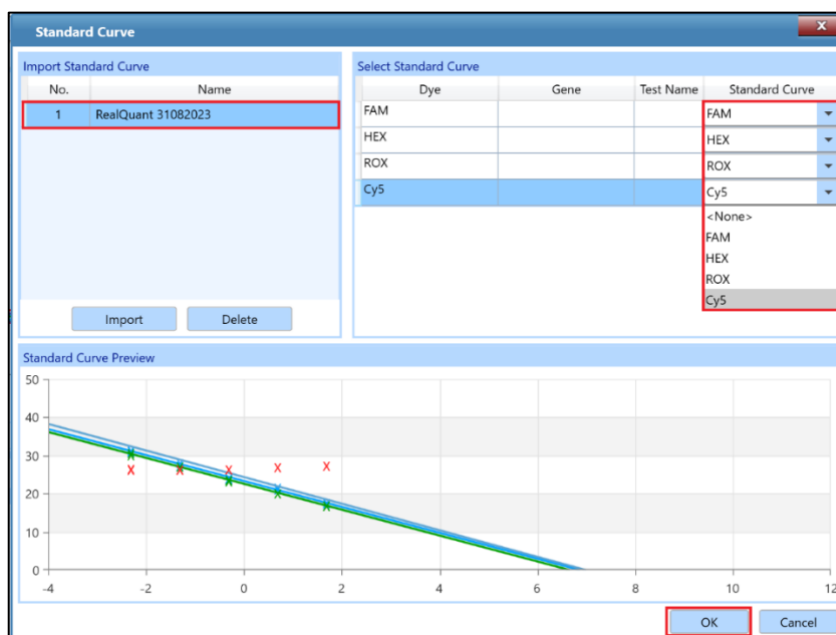


Рисунок 81

8. АНАЛИЗ ДАННЫХ

8.1. Обработка результатов работы прибора АНК

1. Открыть файл данных в программе ANK Shell. Для этого в программе ANK Shell нажать «**Просмотр файлов данных**» и открыть файл с результатами исследования, выбрав его в папке соответствующего прибора.
2. При использовании шаблонов **RQ** или **RQ-F** кликнуть по надписи «**Калибровка**» в правом нижнем углу (рисунок 82).

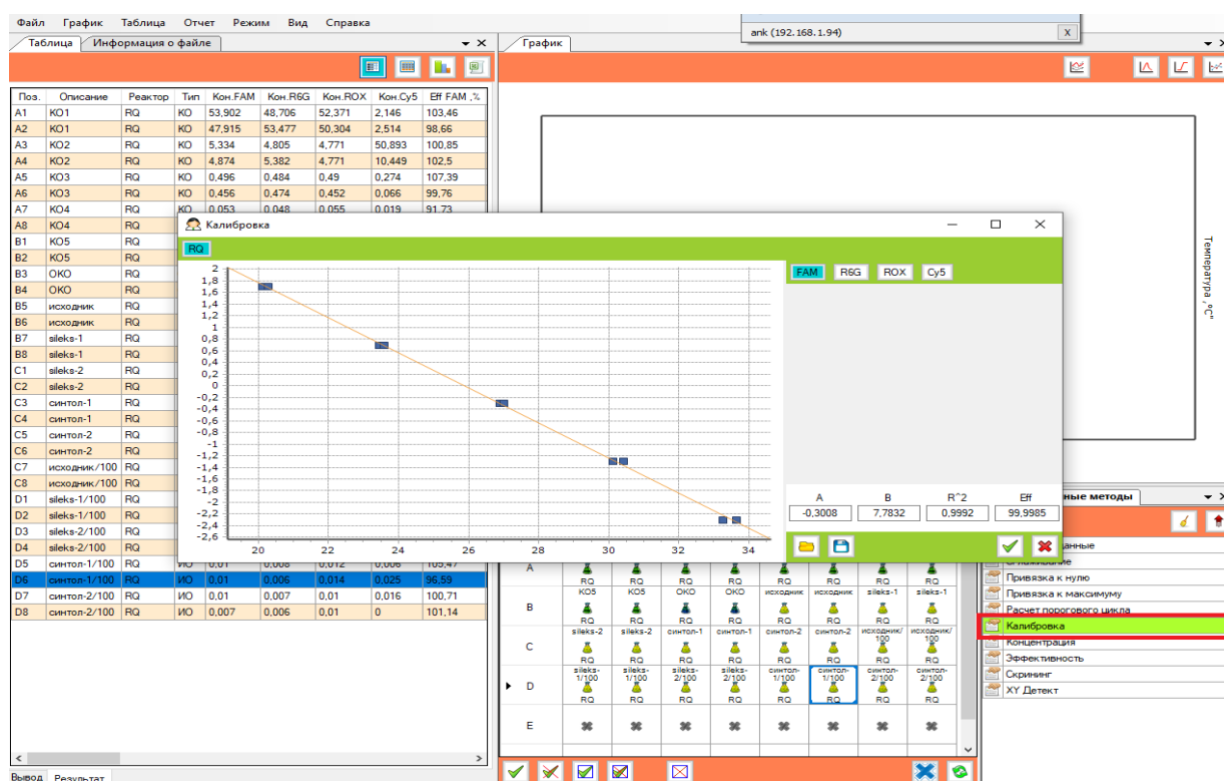


Рисунок 82

3. Убедиться, что параметры калибровочной кривой соответствуют требуемым значениям по каждому каналу ($R^2 > 0,99$; $Eff \geq 95\%$).

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

4. Оценить результаты прохождения ОКО в соответствии с таблицей 7 раздела «Интерпретация результатов».

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

Если параметры калибровочной кривой соответствуют указанным критериям, и результаты прохождения ОКО соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, перейти к п. 5.

5. Перейти на вкладку «ХУ Детект» в раздел «Вывод» (слева внизу) (рисунок 83).

Слева в таблице появятся значения концентраций исследуемых образцов по каналу FAM (концентрация ДНК в исследуемых образцах определяется по короткому фрагменту).

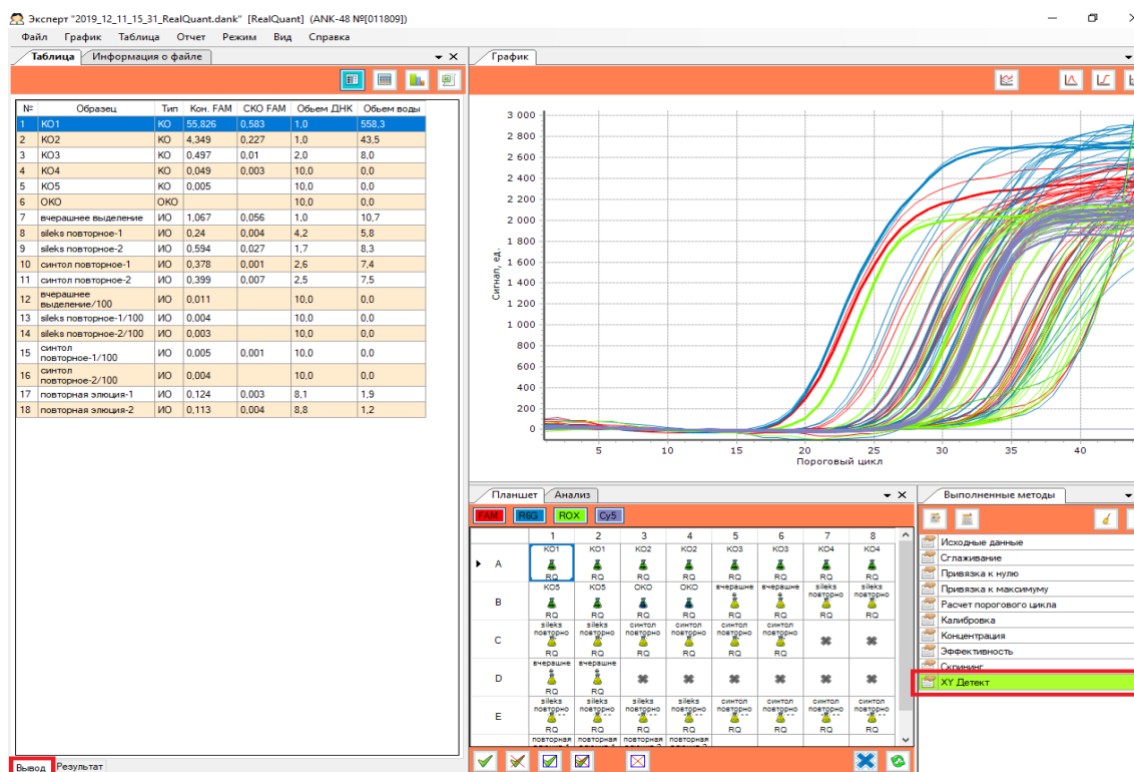


Рисунок 83

6. Перейти в раздел «Результаты» (слева внизу) для оценки степени деградации ДНК в исследуемом образце (рисунок 84). Степень деградации определяется по соотношению концентраций ДНК, полученных по короткому (канал FAM) и длинному (канал R6G) фрагментам.

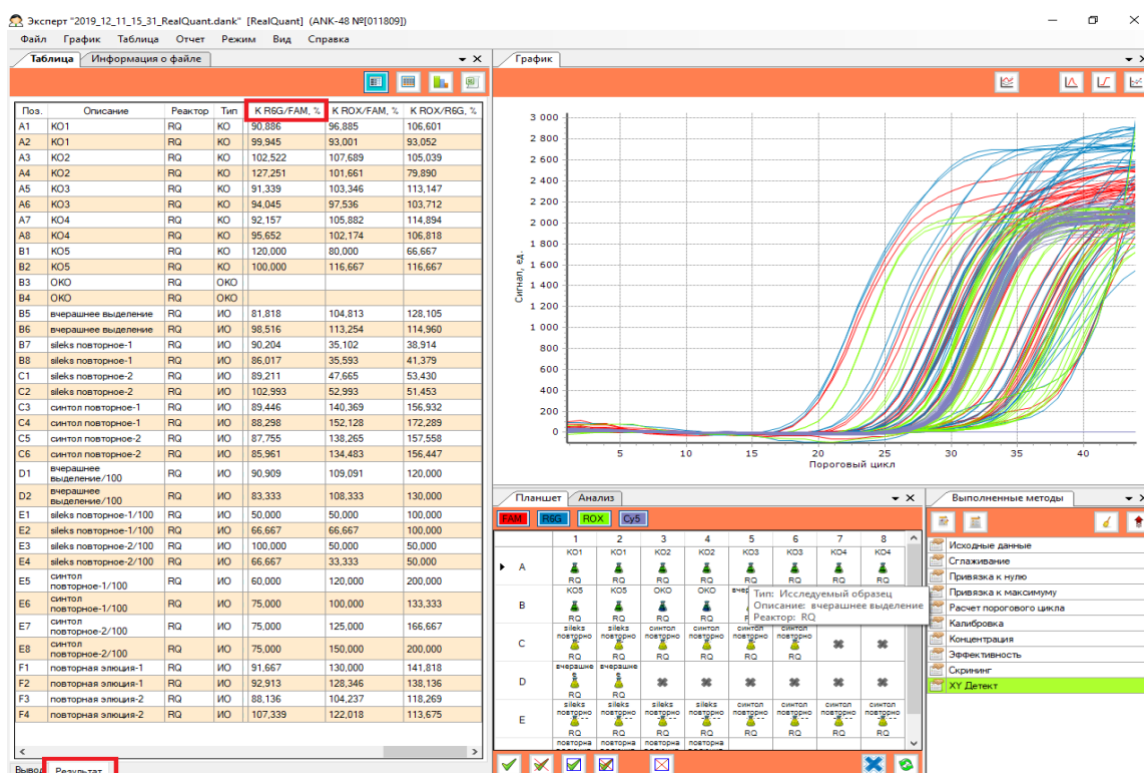


Рисунок 84

7. Сформировать отчет. Для этого сверху нажать вкладку «Отчет» и в выпавшем списке выбрать «Отчет» (рисунок 85).

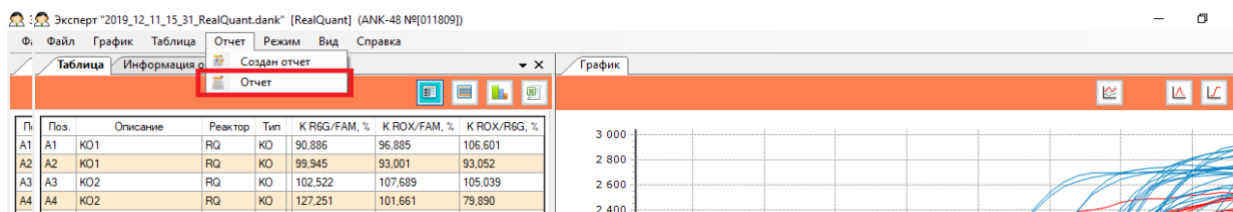


Рисунок 85

8. Оценить полученные результаты для исследуемых образцов в соответствии с разделом 9 «Интерпретация результатов».

8.2. Обработка результатов работы прибора CFX96

1. Открыть файл в программе **Bio-Rad CFX Manager**. Для этого в меню **File** выбрать **Open**→**Data File**, найти обрабатываемый файл и открыть его.
2. Установить расчет результатов анализа методом **Regression**. Для этого в меню **Settings** выбрать **Cq Determination Mode**→**Regression**.
3. Оценить **стандарты (St) KO1-KO5** и калибровочную кривую по каналам **FAM, HEX, ROX**. Убедиться, что параметры калибровочной кривой соответствуют допустимым значениям по каждому каналу ($R^2 > 0,99$; $E \geq 95\%$).

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

4. Включить **все** образцы и контроли, перейти в окно **Quantification Data** и открыть таблицу **Results**. Для корректного отображения количественного результата в **Reports** нажать **1 раз Content, 3 раза Well**. Образцы должны стоять по порядку, начиная со стандартов, дубли образцов должны стоять друг за другом, флуорофоры должны стоять в порядке **FAM, HEX, ROX, Cy5** для каждого образца.
5. Оценить результаты прохождения ОКО в соответствии с таблицей 7 раздела «Интерпретация результатов».

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

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

6. В таблице результатов **Results** оценить значения по каждому каналу (**FAM, HEX, ROX, Cy5**) 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 значения для каждой мишени из столбца **Starting Quantity (SQ)**.

8.3. Обработка результатов работы прибора «ДТпрайм», «ДТлайт» «ДТпрайм II»

1. После окончания ПЦР-РВ автоматически откроется вкладка «Анализ» (рисунок 86).

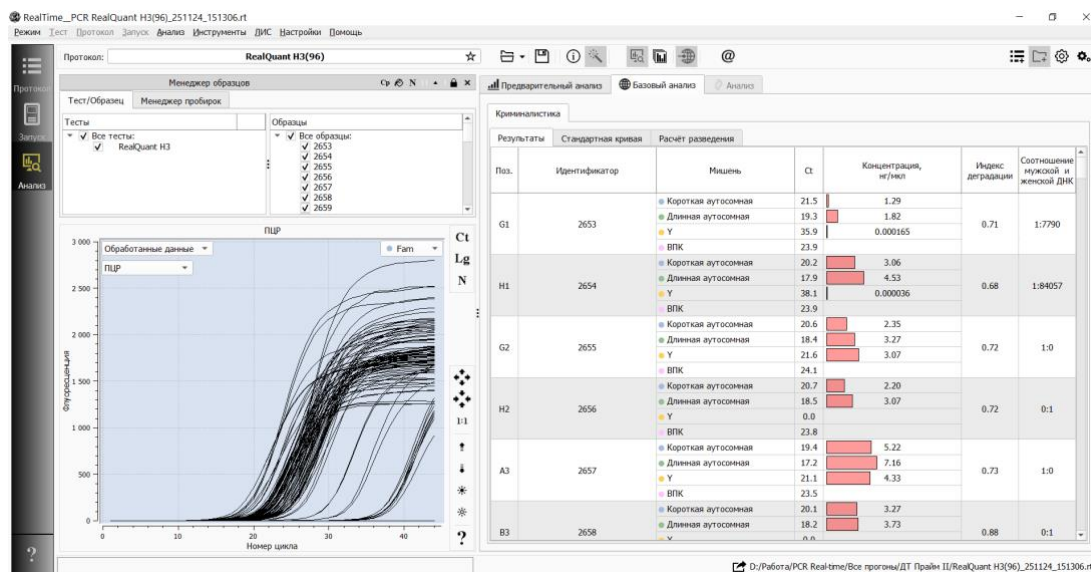


Рисунок 86

2. Во вкладке «Базовый анализ», справа от названия-протокола, проверить во вкладке «Стандартная кривая» кривую на графике для каждой мишени. Убедиться, что эффективность Eff составляет 90-100 %, коэффициент корреляции R^2 не ниже 0,99 (рисунок 87).

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

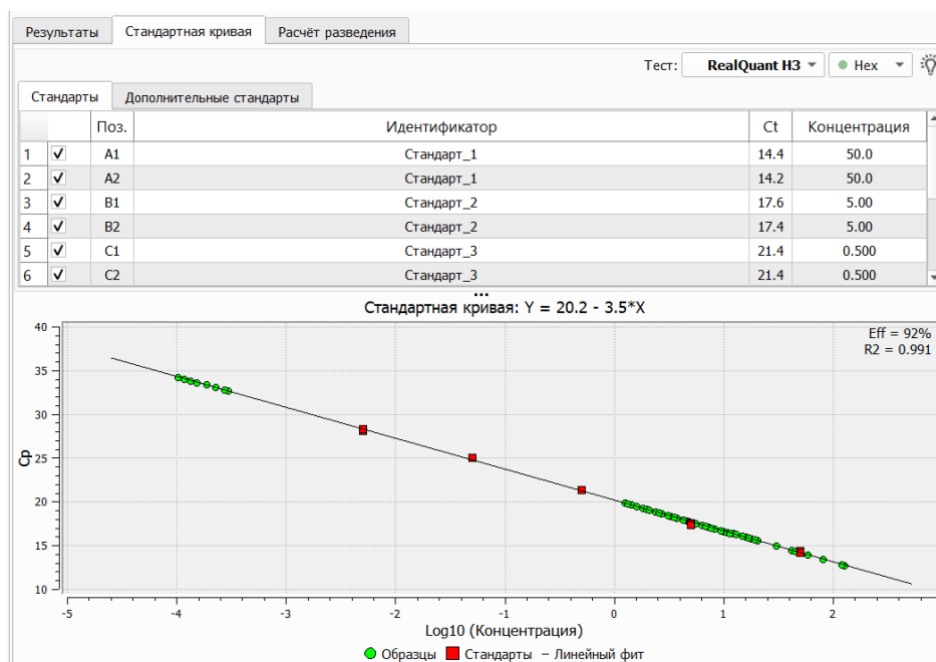


Рисунок 87

3. Оценить результаты прохождения ОКО в соответствии с таблицей 7 раздела 9 «Интерпретация результатов».

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

Если параметры калибровочной кривой соответствуют указанным критериям, и результаты прохождения ОКО соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, перейти к п. 4.

- Во вкладке «**Результаты**» посмотреть результат измерения концентрации для образцов по всем мишеням, значения порогового цикла C_t , индекс деградации и соотношение мужской и женской ДНК (рисунок 88).

Результаты						
Стандартная кривая		Расчёт разведения				
Поз.	Идентификатор	Мишень	C_t	Концентрация, нг/мкл	Индекс деградации	Соотношение мужской и женской ДНК
G2	2655	Короткая аутосомная	20.6	2.35	0.72	1:0
		Длинная аутосомная	18.4	3.27		
		Y	21.6	3.07		
		ВПК	24.1			
H2	2656	Короткая аутосомная	20.7	2.20	0.72	0:1
		Длинная аутосомная	18.5	3.07		
		Y	0.0			
		ВПК	23.8			
A3	2657	Короткая аутосомная	19.4	5.22	0.73	1:0
		Длинная аутосомная	17.2	7.16		
		Y	21.1	4.33		
		ВПК	23.5			
B3	2658	Короткая аутосомная	20.1	3.27	0.88	0:1
		Длинная аутосомная	18.2	3.73		
		Y	0.0			
		ВПК	24.1			
C3	2659	Короткая аутосомная	20.6	2.35	0.72	1:17443
		Длинная аутосомная	18.4	3.27		
		Y	36.2	0.000135		
		ВПК	24.1			
D3	2660	Короткая аутосомная	21.0	1.80	0.67	1:0
		Длинная аутосомная	18.7	2.69		
		Y	22.2	2.02		
		ВПК	23.8			

Рисунок 88

- Правой кнопкой мыши нажать на таблицу с результатами и выбрать, в каком формате сохранить данные (рисунок 89). Можно сохранить их в формате Excel, либо скопировать в буфер обмена и вставить в любой документ.

Результаты						
Стандартная кривая		Расчёт разведения				
Поз.	Идентификатор	Мишень	C_t	Концентрация, нг/мкл		
G2	2655	Короткая аутосомная	20.6	2.35		
		Длинная аутосомная	18.4	3.27		
		Y	21.6	3.07		
H2	2656	Короткая аутосомная	20.7	2.20		
		Длинная аутосомная	18.5	3.07		
		Y	0.0			
		ВПК	23.8			

Рисунок 89

- Во вкладке «**Расчет разведения**» выбрать параметры разведения и мишень, по концентрации которой необходимо развести образцы (рисунок 90). Правой кнопкой мыши нажать на таблицу с расчетом разведения и выбрать, в каком формате сохранить данные.

Результаты Стандартная кривая **Расчёт разведения**

Разведение по мишени

☒ Короткая аутосомная
☐ Длинная аутосомная
☐ Y

Целевая концентрация, нг/мкл: **0.067**

Число этапов разведения: **2**

Максимальный объём разведения, мкл: **1500**

Объём ДНК на разведение, мкл: **5**

	Образец	Исходная концентрация, нг/мкл	Требуется разведение	I этап разведения		II этап разведения	
				ДНК, мкл	Вода, мкл	ДНК, мкл	Вода, мкл
1	2653	1.288	да	5	91		
2	2654	3.064	да	5	224		
3	2655	2.347	да	5	170		
4	2656	2.195	да	5	159		
5	2657	5.221	да	5	385		
6	2658	3.275	да	5	239		
7	2659	2.347	да	5	170		
8	2660	1.127	да	5	129		
9	2661	1.127	да	5	64		
10	2662	1.127	да	5	70		

* - Применяются индивидуальные параметры разведения
 ■ - Не достигнуто значение целевой концентрации при текущих параметрах разведения

Рисунок 90

- Оценить полученные результаты для исследуемых образцов в соответствии с разделом 9 «Интерпретация результатов».

8.4. Обработка результатов работы прибора Line-Gene 9660

8.4.1. Анализ данных

- Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **PCR Gene-9660**.
- Перейти на вкладку «Анализ» (рисунок 91).

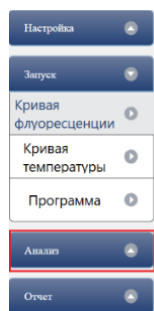


Рисунок 91

- Оценить **калибровочные образцы (St)** и калибровочную кривую. Для этого кликнуть по клавише «Стандартная кривая» (рисунок 92).

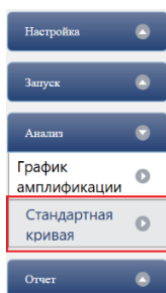


Рисунок 92

4. В графе «Задание» последовательно открыть калибровочную кривую для каждого детектора (рисунок 93).

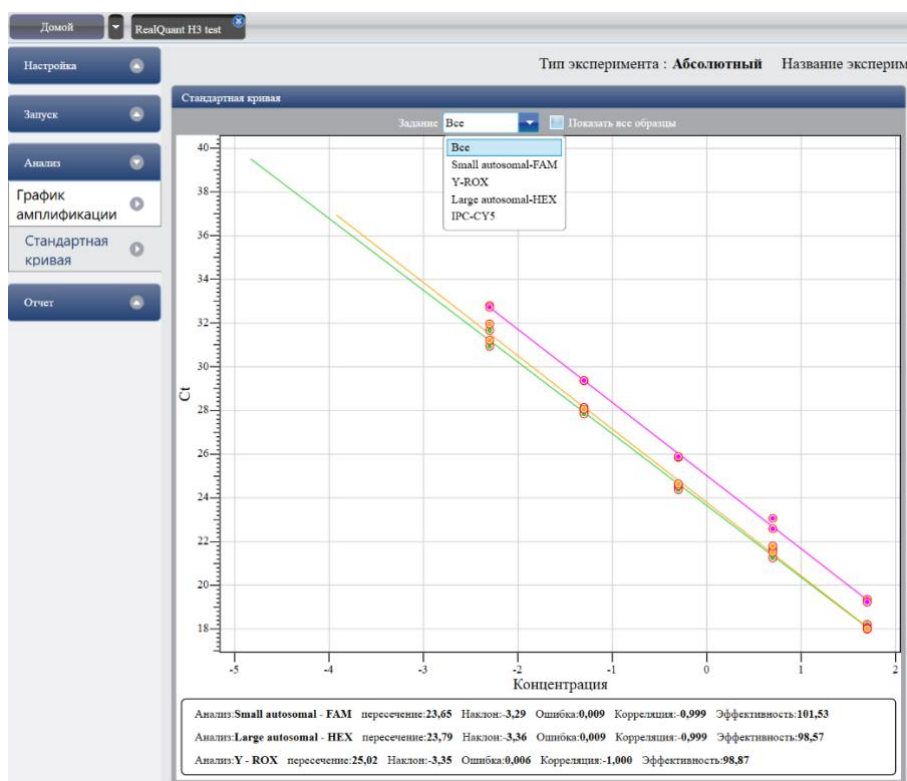


Рисунок 93

5. Убедиться, что параметры каждой калибровочной кривой соответствуют значениям:
- коэффициент корреляции $> 0,99$;
 - эффективность ПЦР не менее 95 %;
 - наклон калибровочной кривой от -3,3 до -3,6.

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

6. В правой части экрана выбрать «Таблица ячеек» (рисунок 94). Кликнуть по заголовку столбца «Ячейка» для расположения последовательности образцов и стандартов в таблице результатов согласно колонкам планшета.

Установка планшета										
Таблица ячеек										
Импортированная стандартная кривая										
#	Ячейка	ID образца	Имя образца	Элемент анализа	Свойство	Краситель	Ct	среднее значение Ct	Ct SD	Рассчита
1	A01	01	St1	Small autosomal	Стандарт	FAM	21,34	18,1	0,16	5,04e+00
1	A01	01	St1	Large autosomal	Стандарт	HEX	19,12	18,03	0,04	2,45e+01
1	A01	01	St1	Y	Стандарт	ROX	22,1	19,29	0,09	7,41e+00
1	A01	01	St1	IPC	Неизвестный	CY5				
13	B01	02	St2	Small autosomal	Стандарт	FAM	24,4	21,45	0,28	5,90e-01
13	B01	02	St2	Large autosomal	Стандарт	HEX	22,48	21,65	0,21	2,45e+00
13	B01	02	St2	Y	Стандарт	ROX	25,43	22,82	0,34	7,54e-01
13	B01	02	St2	IPC	Неизвестный	CY5				
25	C01	03	St3	Small autosomal	Стандарт	FAM	27,8	24,42	0,07	5,43e-02
25	C01	03	St3	Large autosomal	Стандарт	HEX	25,68	24,6	0,05	2,73e-01
25	C01	03	St3	Y	Стандарт	ROX	27,47	25,87	0,03	1,85e-01
25	C01	03	St3	IPC	Неизвестный	CY5				
37	D01	04	St4	Small autosomal	Стандарт	FAM	31,1	27,9	0,08	5,39e-03
37	D01	04	St4	Large autosomal	Стандарт	HEX	29,16	28,11	0,05	2,52e-02
37	D01	04	St4	Y	Стандарт	ROX	29,01	29,37	0,01	6,41e-02
37	D01	04	St4	IPC	Неизвестный	CY5				
49	E01	05	St5	Small autosomal	Стандарт	FAM	35,49	31,3	0,52	2,48e-04
49	E01	05	St5	Large autosomal	Стандарт	HEX	32,6	31,59	0,53	2,37e-03
49	E01	05	St5	Y	Стандарт	ROX	29,97	32,77	0,06	3,31e-02
49	E01	05	St5	IPC	Неизвестный	CY5				
61	F01	06	NTC	Small autosomal	Отрицательный	FAM	39,53			1,47e-05
61	F01	06	NTC	Large autosomal	Отрицательный	HEX	34,49			6,50e-04
61	F01	06	NTC	Y	Отрицательный	ROX	30,02			3,20e-02
61	F01	06	NTC	IPC	Неизвестный	CY5				
73	G01	07	1	Small autosomal	Неизвестный	FAM	36,29	36,29	0	1,42e-04
73	G01	07	1	Large autosomal	Неизвестный	HEX	32,35	32,35	0	2,82e-03
73	G01	07	1	Y	Неизвестный	ROX	30,52	30,52	0	2,28e-02
73	G01	07	1	IPC	Неизвестный	CY5				
85	H01	08	2	Small autosomal	Неизвестный	FAM	33,89	33,89	0	7,64e-04
85	H01	08	2	Large autosomal	Неизвестный	HEX	31,4	31,4	0	5,38e-03
85	H01	08	2	Y	Неизвестный	ROX	30,03	30,03	0	3,18e-02
85	H01	08	2	IPC	Неизвестный	CY5				
2	A02	01	St1	Small autosomal	Стандарт	FAM	20,85	18,1	0,16	7,07e+00
2	A02	01	St1	Large autosomal	Стандарт	HEX	18,9	18,03	0,04	2,86e+01
2	A02	01	St1	Y	Стандарт	ROX	21,93	19,29	0,09	8,32e+00

Рисунок 94

7. Оценить результаты прохождения ОКО в соответствии с таблицей 7 раздела 9 «Интерпретация результатов».

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

Если параметры калибровочной кривой соответствуют указанным критериям, и результаты прохождения ОКО соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, перейти к п. 8.

8. Оценить значения в столбце **СТ** 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 значения для мишеней из столбца «Рассчитанная концентрация» в «Таблицы ячеек».

8.4.2. Автоматический расчет степени деградации и разведения для результатов, полученных на приборе Line-Gene 9660

Для автоматического расчета степени деградации и разведения:

1. В верхней части экрана выбрать «Экспортировать эксперимент» → «Экспортировать в Excel» (рисунок 95).

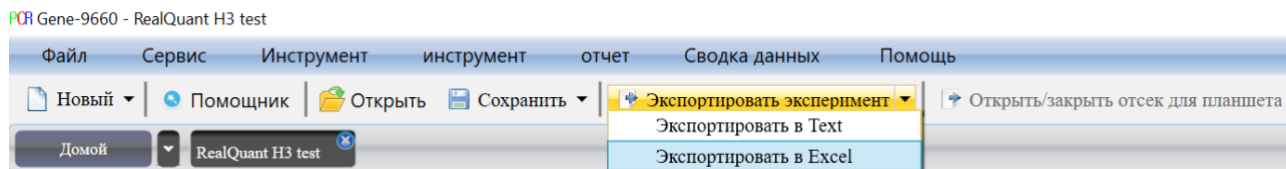


Рисунок 95

- В открывшемся окне выбрать папку для экспорта, присвоить файлу данных название. В разделе «Экспорт элементов» оставить только «Результат(колич.)», поставить галочки «Не экспортировать пустые лунки» и «Объединено в одну папку». Нажать «ОК» (рисунок 96).

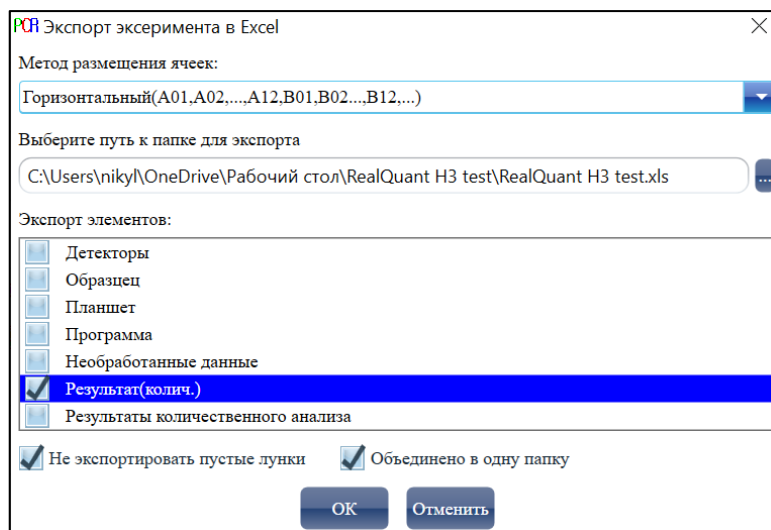


Рисунок 96

- 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».

8.5. Обработка результатов работы прибора Gentier-96/Locus Intero

8.5.1. Анализ данных

- Открыть файл с экспериментом в программе Real-Time PCR System.
- Перейти в раздел «Analysis» (рисунок 97).

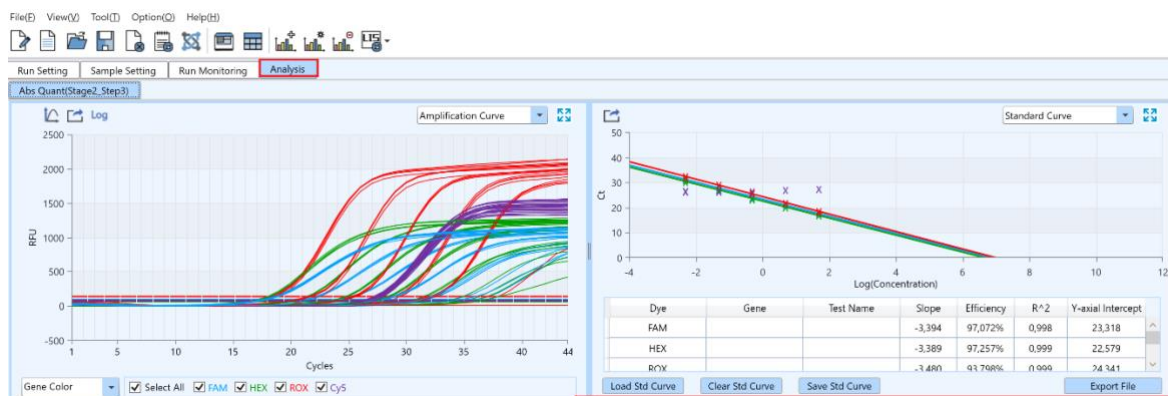


Рисунок 97

- Убедиться, что параметры каждой калибровочной кривой соответствуют значениям:
 - коэффициент корреляции $R^2 > 0,99$;
 - эффективность ПЦР **Efficiency** не менее **95 %**;
 - 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 КО. 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.**

- Оценить результаты прохождения ОКО в соответствии с таблицей 7 раздела 9 «Интерпретация результатов».

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

Если параметры калибровочной кривой соответствуют указанным критериям, и результаты прохождения ОКО соответствуют критериям, при которых результаты всего анализа подлежат учету, перейти к п. 5.

- Оценить значения в столбце «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 значения для мишеней из столбца «Concentration».

8.5.2. Автоматический расчет степени деградации и разведения для результатов, полученных на амплификаторе Gentier-96/Locus Intera

Для автоматического расчета степени деградации и разведения:

- Открыть файл с экспериментом в программе **Real-Time PCR System**. Перейти в раздел «Analysis».
- Внизу справа в окне «**Result Table**» нажать на кнопку «**Table Management**» (рисунок 98).

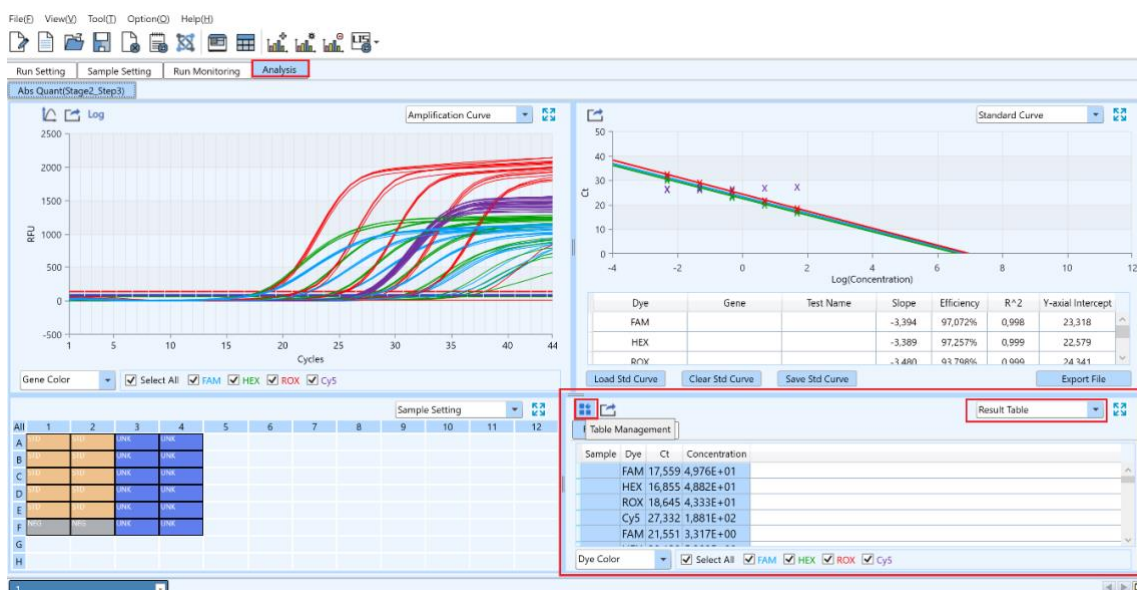


Рисунок 98

3. В открывшемся окне в разделе «**Column Name**» отметить следующие позиции: «**Sample**», «**Dye**», «**Ct**», «**Concentration**». Нажать кнопку «**OK**» (рисунок 99).

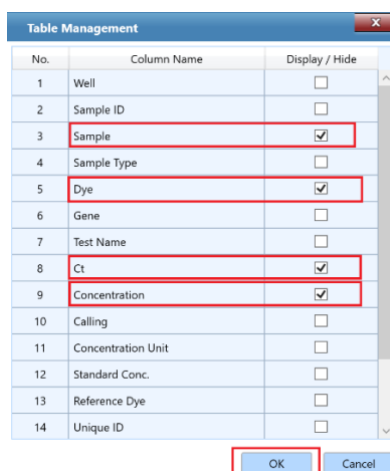


Рисунок 99

4. Нажать кнопку «**Export**» и выбрать папку, куда сохранить файл формата .XLS (рисунок 100).

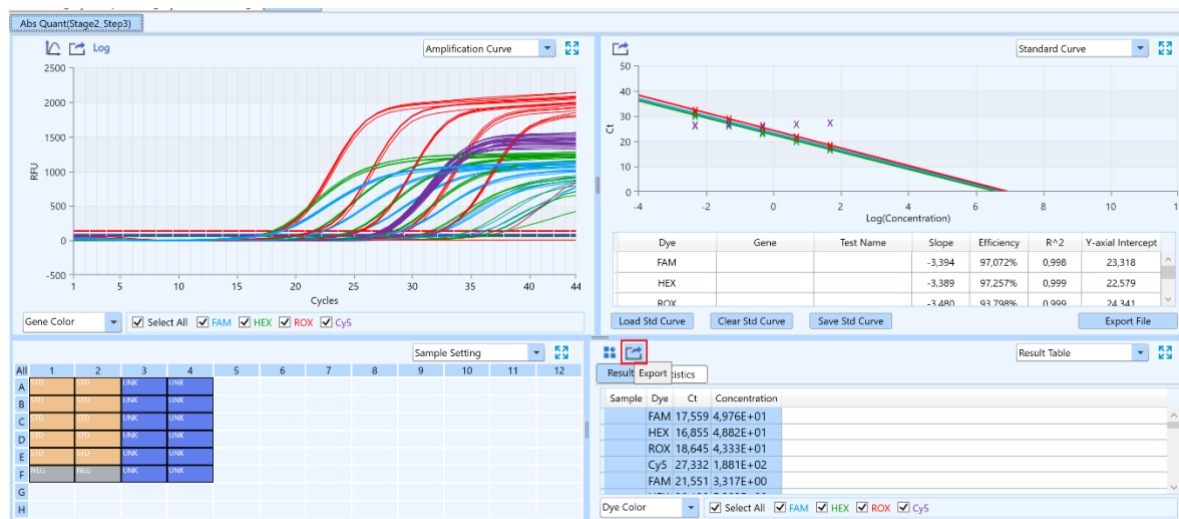


Рисунок 100

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 7.

Таблица 7 – Интерпретация результатов

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

Образец	Результат ПЦР-РВ по мишени				Интерпретация результата
	FAM	HEX	ROX	Cy5	
	aS	aL	Y	IPC	
	Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ct≤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 (Ct≤35,0)	Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (Ct≤CtNC+2)	
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ct≤35,0)	Нет кривой амплификации/ Есть кривая амплификации после 35 цикла (Ct >35,0)				
Образцы с ингибиторами ПЦР					
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ct≤35,0)			Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	В пробе содержится ДНК человека, мужского пола, ингибирование ПЦР-РВ.	
Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ct≤35,0)		Нет кривой амплификации/ Есть кривая амплификации после 35 цикла (Ct >35,0)	Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	В пробе содержится ДНК человека женского пола, ингибирование ПЦР-РВ.	
Образцы без ДНК человека					
Нет кривой амплификации/ Есть кривая амплификации после 35 цикла (Ct >35,0)			Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (Ct ≤CtNC+2)	В пробе отсутствует ДНК человека.	
Обозначения: КО – калибровочный образец, ОКО – отрицательный контрольный образец ПЦР, ИО – 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 Ct для мишени Y. Наличие значений $Ct \leq 35,0$ говорит о присутствии мужской ДНК в образце, отсутствие сигнала или $Ct > 35,0$ о

женской ДНК.

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

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

, где

Y (нг/мкл) – концентрация мишени Y , 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 Ct внутреннего положительного контроля (IPC). Значения Ct для IPC в исследуемых образцах не должны превышать значения Ct для IPC в отрицательном контроле (ОКО) более чем на 2 цикла: $Ct \leq Ct_{nc} + 2$. Получение значений, превышающих значение Ct для IPC в ОКО более чем на 2 цикла ($Ct > Ct_{oko} + 2$), будет свидетельствовать о наличии ингибиторов в образце ДНК.

Если по основным мишеням (aS , aL и Y) сигнал не детектируется, а по IPC сигнал есть, но его значение $Ct > Ct_{oko} + 2$, 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