

HG-403AB100 HG-403AB200 HG-403AB400

RealQuant H3

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

ИНСТРУКЦИЯ по применению (7500 Real-Time PCR System, QuantStudio5)





Содержание

1.	ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	3
1.1.	Описание набора	3
1.2.	Область применения	4
2.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	5
2.1.	Состав набора	5
2.2.	Количество анализируемых проб	5
2.3.	Условия хранения и транспортирования, срок годности	5
2.4.	Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование	5
3.	ПОДГОТОВКА АМПЛИФИКАЦИИ	6
3.1.	Подготовка калибровочных образцов	6
3.2.	Подготовка к проведению реакции ПЦР-РВ	6
4.	ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	8
4.1.	Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio»	8
4.1.1	.Запуск ПЦР-РВ	8
4.2.	Программное обеспечение HID в режиме «Custom Assays»	.10
4.2.1	. Создание шаблона эксперимента	.10
4.2.2	. Установка шаблона для режима	.17
4.2.3	. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3	.17
4.3.	Заполнение названия образца в шаблоне Exel	.22
4.4.	Программное обеспечение QuantStudio TM Design&Analysis	.24
4.4.1	. Создание шаблона эксперимента	.24
4.4.2	. Установка шаблона	.30
4.4.3	. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3	.30
5.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	.32
5.1.	Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio»	.32
5.1.1	. Обработка результатов	.32
5.1.2	.Виртуальная калибровочная кривая	.33
5.2.	Программное обеспечение HID в режиме «Custom Assay»	.35
5.2.1	. Обработка результатов	.35
5.2.2	. Автоматическая оценка результатов	.39
5.3.	Программное обеспечение QuantStudio Design& Analysis Software	.40
5.3.1	. Обработка результатов	.40
5.3.2	Автоматическая оценка	.43
6.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	.44



1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание набора

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

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

Для повышения чувствительности детекции в наборе «RealQuant H3» используются многокопийные локусы генома человека. Амплификация многокопийных аутосомных фрагментов разного размера позволяет провести достоверную оценку концентрации и качества ДНК в исследуемом образце, а амплификация многокопийного фрагмента Y-хромосомы позволяет определить половую принадлежность.

N⁰	Мишень	Описание фрагмента	Краситель
1	Y	ДНК Ү-хромосомы	FAM
2	Small autosomal	аутосомная ДНК, короткий фрагмент	VIC
3	Large autosomal	аутосомная ДНК, длинный фрагмент	TAMRA
4	IPC	внутренний положительный контроль	ROX

В таблице приведены мишени и используемые красители:

Пассивный референсный краситель – МР.

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

Длинный фрагмент аутосомной ДНК (Large autosomal) 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 степени деградации ДНК в образце и спрогнозировать необходимое количество ДНК, которое нужно внести в STR-реакцию для получения полного профиля.

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

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

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

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

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



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

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

1.2.Область применения

Набор может быть использован в лабораториях бюро судебно-медицинских экспертиз и в лабораториях экспертно-криминалистических центров. Результаты, полученные с использованием набора «RealQuant H3» могут помочь в:

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

- определении количества образца ДНК для использования в STR анализе в связи со степенью деградацией и наличием ингибиторов;



2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

2.1. Состав набора

			0.5	Количество			
JN⊇	Наименование	Состав	Ооъем	HG-	HG-	HG-	
				403AB100	403AB200	403AB400	
1	DC DOAD	2.5x Destruction and a	1 мл	1	2	4	
1	ТС-КДАВ	2,5х Реакционная смесь	1 MJI	пробирка	пробирки	пробирки	
2		Смесь специфических	1 мл	1	2	4	
2	СПЭ-КОАВ	праймеров и зондов	I MJI	пробирка	пробирки	пробирки	
		Стабилизированный					
2	ДНК человека	раствор ДНК человека	0,03	1	2	4	
5	3	мужского пола в	МЛ	пробирка	пробирки	пробирки	
		концентрации 50 нг/мкл					
1	THE Sydon	Буфер для разведения	1.2 мл	1	2	4	
4	дик-өуфер	ДНК человека	1,2 MJI	пробирка	пробирки	пробирки	
		Отрицательный		1	2	4	
5	ОКО	контрольный образец,	0,2 мл	I HROGHRKO	пробирки	пробирки	
		H ₂ O		прооирка			

2.2.Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение 100 (HG-403AB-100) или 400 (HG-403AB-400) реакций, включая контрольные образцы.

2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности

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

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

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

2.4. Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование

- 1. Штатив для микропробирок 1,5 мл ("PM-96х1,5 /2,0", кат. № СТ-17).
- 2. Пробирки для реакционной смеси объемом 1,5 или 2,0 мл.
- 3. Пробирки для приготовления калибровочных образцов ДНК объемом 1,5 мл.
- 4. Штатив для ПЦР плашек или стрипов. ("ПЦР-96", кат. № СТ-12).
- 5. Дозатор переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.
- 6. Наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.
- 7. ПЦР планшеты или микропробирки в стрипах для ПЦР, совместимые с АВ 7500
- 8. Пленка для ПЦР планшет или крышки к микропробиркам в стрипах.
- 9. Крышки к микропробиркам в стрипах.
- 10. Прибор ПЦР-РВ 7500 Fast или 7500 Real-Time PCR System



3. ПОДГОТОВКА АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Подготовка калибровочных образцов

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

1. Пробирки с ДНК человека, 50 нг/мкл (St1), и ДНК-буфером разморозить, перемешать на вортексе и центрифугировать для сброса капель.

2. Отобрать и маркировать 4 микропробирки объемом 1,5 мл (St2, St3, St4, St5).

3. Приготовить калибровочные образцы St2, St3, St4, St5 в соответствии с приведенной ниже таблицей:

	Концент	Объемы	Разведение
Стандарт	рация,		
	нг/мкл		
St1	50	ДНК человека, 50 нг/мкл	1x
St2	5	10 мкл St1 + 90 мкл ДНК-буфера	10x
St3	0,5	10 мкл St2 + 90 мкл ДНК-буфера	10x
St4	0,05	10 мкл St3 + 90 мкл ДНК-буфера	10x
St5	0,005	10 мкл St4 + 90 мкл ДНК-буфера	10x

- В подготовленные пробирки для калибровочных образцов St2, St3, St4, St5 добавить 90 мкл ДНК-буфера;
- В пробирку для St2 добавить 10 мкл St1, используя наконечник с аэрозольным барьером, тщательно перемешать сначала пипетированием, затем на вортексе, кратковременно центрифугировать для сброса капель;
- В пробирку для St3 добавить 10 мкл St2, тщательно перемешать сначала пипетированием, затем на вортексе, кратковременно центрифугировать для сброса капель;
- В пробирку для St4 добавить 10 мкл St3, тщательно перемешать сначала пипетированием, затем на вортексе, кратковременно центрифугировать для сброса капель;
- В пробирку для St5 добавить 10 мкл St4, тщательно перемешать сначала пипетированием, затем на вортексе, кратковременно центрифугировать для сброса капель.

ВНИМАНИЕ!!! После добавления каждого образца **St** необходимо менять наконечник. После добавления ДНК раствор необходимо пипетировать не менее 10 раз. Приготовленные калибровочные образцы ДНК могут храниться при температуре от +2°C до +8°C в течение 14 суток для повторного использования.

3.2. Подготовка к проведению реакции ПЦР-РВ

1. Для приготовления рабочей реакционной смеси (PC) рассчитать требуемые количества реагентов PC-RQAB и СПЗ-RQAB исходя из таблицы и количества образцов:

Реагент	Расход реагентов				
	на 1 реакцию, мкл	рекомендуемое количество для N* образцов			
PC-RQAB	10	10 x (2N*+12)			
СПЗ-RQAB	10	10 x (2N*+12)			

где N – количество исследуемых образцов; 12 – контрольные образцы (St, NC) в двух повторах.

БСИНТО

ПРИМЕЧАНИЕ!!! Рекомендуемая формула расчета предполагает проведение реакции для каждого исследуемого и контрольного образца в повторе.

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

ПРИМЕЧАНИЕ!!! После размораживания допускается хранение **PC-RQAB** и **CП3-RQAB** при температуре от +2°C до +8°C в течение месяца. Допускается повторное замораживание компонентов **PC**.

3. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем PC-RQAB

и СПЗ-RQAB, перемешать смесь на вортексе и центрифугировать.

4. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по 20 мкл приготовленной РС.

5. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в пробирки (на стенку) по 2 мкл исследуемых образцов, отрицательный контрольный образец (ДНК-буфер), калибраторы St5, St4, St3, St2 и St1

6. Закрыть ПЦР пробирки.

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

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

			I CROM	ындует		лдок с .	педова		изцов і	5 iipiioo	p e	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Α	St1	St1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
В	St2	St2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
С	St3	St3	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D	St4	St4	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Е	St5	St5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
F	Ν	Ν	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
G	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Η	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Рекомендуемый порядок следования образцов в приборе

где St1- St5 — калибровочные образцы, \mathbb{N} — отрицательный контрольный образец, \mathbb{U} — исследуемый образец.



4. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1.Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio»

ВАЖНО!!! Использовать стандартный режим программного обеспечения HID возможно только в случае калибровки амплификатора спектральным калибратором – Spectral calibration RQ-AB7500 или QS5.

4.1.1. Запуск ПЦР-РВ

1. Открыть программу HID, кликнуть по иконке «Trio»



2. В открывшемся окне в графе «Experiment Name» задать имя эксперимента

File	File Edit Instrument Analysis	Assays Tools Help	
	🔝 New Experiment 👻 🎯 Open	. 🚽 Save 🗸 🖆 Close 🛷 Export 👻 📇 Print Report	
	Experiment Menu «	Experiment: RealQuant	Type: HID Standard Curve
	Setup	Experiment Properties	
	Experiment Properties	Enter experiment information.	
	Plate Setup	How do you want to identify this experiment?	
	Run Mathad	* Experiment Name: RealQuant	
		Barcode (Optional):	
	Run	User Name (Optional):	
	Analysis	Comments (Optional):	
	1889 4		

3. Перейти на вкладку «Plate Setup»





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

Experiment: RealQuant		Туре: Н	IID Standard Cu	rve	Kit Name : Quantifiler Trio		START RUN 除	?
Define Targets and Samples Assign	Targets and Samples							
Instructions: Define the targets to quantify and the s	amples to test in the reaction plate.							
Defined Targets					Define Samples			
Target Name	Reporter	Quencher	Colour		Add New Sample A Id Saved Sample Save Sample Delete Sample			
T.Large Autosomal	ABY	QSY7		~	Sample Name	Color	Sample Type	
T.Small Autosomal	VIC	NFQ-MGB		~	Trio Standard 1		✓ Standard	
T.IPC	JUN	QSY7		~	Trio Standard 2		✓ Standard	
T.Y	FAM	NFQ-MGB		~	Trio Standard 3		✓ Standard	
					Trio Standard 4		✓ Standard	
					Trio Standard 5		✓ Standard	
					NTC		V NTC	
					Sample 1		V UnKnown	

5. Расположить стандартные образцы (Trio Standard) согласно их положению в плашшете, присвоить названия исследуемых образцов соответствующим лункам планщета.

🔝 New Experiment 👻 🎯 Open	🛃 Save 👻 📔 Close 🛷 Export 👻 📇 Print Report		
Experiment Menu «	Experiment: RealQuant		Type: HID Standard Curve
Setup	Define Targets and Samples Assign Targets and Instructions: Standards and NTC are set by default	ind Sam	nples
Plate Setup	Select wells, then assign targets if applicable. Assign sample(s) to the selected wells.		View Plate Layout View Well Table
Run Method	Assign Sample		Show in Wells View Legend
Rup		-	
Analysis	Sample 1		A TIPC T.Large Autoso T.Large Autoso T.Large Autoso
1111	Sample 2		T.Small Autoso T.Small Autoso T.Small Autoso
	Assign target(s) to the selected wells.		T IPC T IPC T.Large Autoso T.Small Autoso T.Small Autoso
4-	Assign Target Task Quantity T.Large Auto		C T IPC. T.Large Autoso T.Small Autoso T.Small Autoso
	T.Small Auto Image: Simple Autoremain Autorem		T IPC: T IPC D T.Large Autoso T.Small Autoso T.Small Autoso
			E T.IPC T.Large Autoso T.Large Autoso T.Small Autoso T.Small Autoso
			F TIPC. T.Large Autoso T.Small Autoso T.Small Autoso
	Mixed 🚺 Unknown 😒 Standard 🔝 Negative Control		6
	Select the dye to use as the passive reference.		н
"			Wells: 11 Unknown S 10 Standard N 2 Negative Control
A Home Untitled ×			

6. В правом верхнем углу нажать «Start Run»

Kit Name : Quantifiler Trio	START RUN 🔝 🕐

7. В открывшемся окне выбрать папку для сохранения данных и нажать «Сохранить». Прибор начнет работу.



4.2. Программное обеспечение HID в режиме «Custom Assays»

4.2.1. Создание шаблона эксперимента

Для создания шаблона в программном обеспечении **HID** необходимо перейти в режим «**Custom Assays**», для чего открыть программу и кликнуть по соответствующей иконке.



1. Кликнуть по иконке «Advanced Setup».



2. Для прибора 7500 Real-Time PCR System в открывшемся окне установить следующие параметры:

Induned Adaption Adaption Fords Help Specification Constrained Con	Type: Standard Curve	Reagents: TaqMan@ Reagents	START RUN ⊵	
etup	Experiment Properties			
performent Properties	Enter an experiment name, select the instrument type, select the type of experime	nt to set up, then select materials and methods for the PCR reactions and instrum	ent run.	
te Setup	How do you want to identify this experiment?			
n Method	* Experiment Name: RealQuant			
uction Setun	rime: Real/Likant Figs: Standard Curve Reagents: TapAdmit Reagent			
	Commenta (Optional):			
tornels List				
un	Which instrument are you using to run the experiment?			
nalysis	√ 7500 (96 Wells)	7500 Fast (96 Wells)		
	Set up, run, and analyze an experiment using a 4- or 5-color, 96-well system.			
	What type of experiment do you want to set up?			
	✓ Quantitation - Standard Curve	Quantitation - Relative Standard Curr	e Quantitation - Com	parative Ct (ΔΔCt)
	Melt Curve	Genotyping	Presencel	Absence
	Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in	samples.		
	Which reagents do you want to use to detect the target sequence	?	the second s	
	✓ TaqMan® Reagents	SYBRØ Green Reagents	Oth	lor :
	The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a T	aqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence.		
	Which ramp speed do you want to use in the instrument run?			
	✓ Standard (~ 2 hours to complete a run)	Spearment Properties Or an exercented range, select the source tages and used on the PCR reactions and reactioned tages. Concenter Concenter Tages, select the source tages and used on the PCR reactions and reactioned tages. Concenter Concenter Tages, select the source tages and used on the PCR reactions and reactioned tages. Concenter Concenter Concenter Tages and tages and tages and tages and reactioned tages. Vibro Instrument are you used to form the experiment? Vibro Instrument do you want to step? Out and and/or an experiment? Vibro Instrument do you want to step? Out and and/or an experiment? Vibro Instrument do you want to step? Out and and/or an experiment? Vibro Instrument do you want to step? Out and and/or an experiment? Vibro Instrument do you want to step? Out and and/or an experiment? Vibro Instrument do you want to step? Out and and/or an experiment? Out and and/or an experiment? Vibro Instrument do you want to step? Out and and/or an experiment? Vibro Instrument do you want to step? Out and and/or an experiment? Vibro Instrument do you want to step to defect the target sequence? Vibro Instrument do you want to step to defect t		
	For optimal results with the standard ramp speed, Applied Biosystems recommend	using standard reagents for your PCR reactions.		

Для прибора 7500 Real-Time PCR System Fast:



ile Edit Instrument Analysis	Assays Tools Help		
🔄 New Experiment + 🧉 Open	🔄 📓 Save + 📸 Close 🔊 Export + 📇 Print Report		
Experiment Menu «	Experiment: Untitled	Type: Standard Curve Re	eagents: TaqMan® Reagents
Jetup	Experiment Properties		
Experiment Properties	Enter an experiment name, select the instrument type, select the type of experiment to set up, t	then select materials and methods for the PCR reactions and instrument run.	
Plate Setup	How do you want to identify this experiment?		
Run Method	* Experiment Name: Untitled		
Reaction Setup	Barcode (Optional): User Name (Optional):		
Materials List	Comments (Optional)		^
Run	*Which instrument are you using to run the experiment?		
Analysis	7500 (96 Wells)	✓ 7500 Fast (96 Wells)	
	Set up, run, and analyze an experiment using a fast cycling 5-color, 96-well system.		
	• What type of experiment do you want to set up?		
	✓ Quartitation - Standard Curve	Quantitation - Relative Standard Curve	Quantitation - Comparative Cr (ΔΔCr)
	Melt Curve	Genetyping	Presence/Absence
	Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples.		
	· Which reagents do you want to use to detect the target sequence?		
	✓ TaqMan® Reagents	SYBR® Green Reagents	Other
	The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® prof	e designed to detect amplification of the target sequence.	
	• Which ramp speed do you want to use in the instrument run?		
	✓ Standard (~ 2 hours to complete a run)	Fast (~ 40 minutes to complete a run)	
	For optimal results with the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends using stand	ard reagents for your PCR reactions.	
«			

3. Перейти на вкладку «Plate Setup» в левой верхней части монитора.



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

Setup Dofine Targets and Samples Setup Setup <	Connorm Pronta (Experiment: RealQuant		Type: Standard Curve	Reagents: TaqMan® Reagents	START RUN
Expension Properties Instructions: Define the targets to guantify and the samples to tool in the reaction plate. Public Medical Perfine Stringets Define Stringets Define Stringets Define Stringets Run Mached Randragis Target Name Reacher Define Stringets Stangle Stangle Stangle Stangle Stangle	etup	Define Targets and Samples A	ssign Targets and Samples			
Define Strigets Define Strigets Num Modod Num Modod Num Modod Run Analysis Define Biological Replicate Groups Define Biological replace groups in the reaction plate, click Add Biological Group. Then define the Biological groups. Mod Biological Corput	eriment Properties	Instructions: Define the targets to quantity and	id the samples to test in the reaction plate.			
Add New Target Sales Target Sales Target Sales Target Sales Target Sales Target Add Sales Target	le Setur	Define Targets		Define S	amples	
an Model here cook Semp Aternate Last Analysis		Add New Target Add Saved Target Save	Target Delete Target	Add Net	v Sample Add Saved Sample Save Sample Detele Sample	
exectors Setting Run Analysis Define Biological Replicate Groups Define Biological Crew in the station plate, click Add Biological Grow, then define the biological group. Add Biological Crew in Define Biological Crew in the station plate, click Add Biological Grow, then define the biological group. Add Biological Crew in Define Biological Crew in the station plate, click Add Biological Grow, then define the biological group.	Method	Target Name	Reporter Qu	uencher Colour Sample	Name	Color
	ction Setup	Target 1	FAM V NF	FO-MGB V Sample	1	
Run Analysis Define Biological Replicate Groups Define Biological replicate Groups Define Biological replicate Groups Define Biological replicate group in the readon plate, click Add Biological Group, then define the biological group. Add Biological Group Define Biological Croup Define Biologi	erials List					
Analysis The Biological Replicate Groups The Biological Replicate Groups The Biological Replicate Groups The Biological replate group in the reacton plate, click Add Biological Group, then define the biological group. The Biological Group Define Biological Crew Define Biological Group Define Biological Group Define Biological Group Define Biological Group. The Biological Group Define Biological Crew Define Biological Group Define Biol	un					
	nahusis					
Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate group in the reaction plate, click Add Biological Group, then define the biological group. Add Biological Group Diffus Biological Croup Diffus Biological Croup Diffus Biological Croup	1017313					
Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate group in the reaction plate, click Add Biological Group, then define the biological group. IAdd Biological Group Utility Biological Croup						
Instructions: For each biological replicate group in the reaction plate, click Add Biological Group, Then define the biological group. Add Biological Group Dubins Biological Croup						
Add Biological Group Delinits Biological Group		Define Biological Replicate Groups				
		Define Biological Replicate Groups	oup in the reaction plate, click Add Biological G	iroup, then define the biological group.		
Biological Group Name Color Comments		Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate o Add Biological Group Online Biological Group	oup in the reaction plate, click Add Biological G	iroup, then define the biological group.		
		Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate o Add Biological Group Cellus Biological Coo Biological Group Name	oup in the reaction plate, click Add Biological G	iroup, Then define the Mological group.	Comments	
		Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate g Add Biological Group Toribin Biological Group Name Biological Group Name	oup in the reaction plate, click Add Biological G 19	irreep. Then define the Mological group.	Comments	
		Define Biological Replicate Groups Telefine Biological Replicate Groups Telefine Biological Crow Colline Biological Group Colline Biological Group Name	oup in the reaction plate, chick Add Biological G	irrow, then define the biological group:	Comments	
		Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate ge Add Biological Group Celles Biological Group Biological Group Name	oup in the reaction plate, chick Add Biological G	Iroop, then define the biological group.	Comments	
		Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate g Add Biological Group In Cellin Biological Group Name Biological Group Name	oup in the reaction plate, chick Add Biological G	Iroop, then define the biological group.	Comments	
		Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate g Add Biological Group Indus Biological Group Name Biological Group Name	oup in the reaction plate, chick Add Biological G	Irreep. Then define the biological group.	Comments	
		Define Biological Replicate Groups Instructions: For each biological replicate of Indd Biological Group I: Duline Biological Crow Biological Group Name	oup in the reaction plate, click Add Biological G	Irreep. Then define the biological group.	Comments	Apportments

5. Обозначить мишени и выбрать для них соответствующие красители.



Define Targets and Samples	Assign Targets and	Samples		
Instructions: Define the targets to quan	ntify and the samples to test i	n the reaction plate.		
Define Targets				
Add New Target Add Saved Target	Save Target Delete Targe	t		
Target Name	Reporter		Quencher	Colour
Large Autosomal	TAMRA	\sim	None ~	· 📃 🗸
Small Autosomal	VIC	\sim	None ~	· 🖌
<u>Y</u>	FAM	\sim	None ~	· 🔁 🗸
IPC	ROX	\sim	None ~	· 📕 🗸

6. В разделе «Define Samples» к Sample 1 добавить еще пять образцов, кликая по «Add New Sample».

Add Saved Sample	Save Sample	Delete Sample	
	Add Saved Sample	Add Saved Sample Save Sample	Add Saved Sample Save Sample Delete Sample

7. Переименовать образцы в **Standart 1, 2, 3, 4, 5** и **NC**.

8. Перейти на вкладку «Assign Targets and Samples».

D	efine Targets	and Samples	Assign Targets and Samples					
Į	Instructions: D	efine the targets to qu	antify and the sa	amples to test in t	he reaction pla	te.		
Define Targets								
	Add New Target	Add Saved Target	Save Target	Delete Target				



9. Расположить калибровочные образцы St в плашке и отметить «Assign».

Assign targ	et(s) to the se	elected wells.		<	Γv	'iew Plate Lay	out View	Well Table
[1			>	ĺ			
Assign	Target	Task	Quantity		_		4	
\checkmark	Large Autos				E	Show in Wells	View L	egend
	Small Autos				Г	1	2	3
\checkmark	Y	U S N					The second second	
	IPC				A	Small Autos	U Small Autos	
∗ Mi	ixed 🔟 Unknown	S Standard 🔝 Negativ	e Control					
Pag. Define	and Set Up Stand	ards			в	U Large Autos	U Large Autos	
						Small Autos	Small Autos	
Assign sam	ple(s) to the s	elected wells.				I arge Autos	I arge Autos	
				1	С	Small Autos	Small Autos	
Assign	Sample							
	Sample	1		1		Large Autos	Large Autos	
					ľ	Small Autos	U Small Autos	
					Е	Large Autos	Large Autos	
Assign sam	ple(s) of sele	cted well(s) to biolog	gical group.			Autos	Sinal Addos	
Assign	Biologic	cal Group			F			
haaigii	Biologic	ai oroup			Ľ			

10. Отметить калибровочные образцы как стандарты S по всем мишеням, кроме IPC. Для мишени IPC – оставить U.

Assign targ	et(s) to the se	elected wells.		1	V	iew Plate La	yout	View V	Vell Table
Assign	Target	Task	Quantity	1	_				
	Large Autos		1			Show in Wells	•	View Le	gend
	Small Autos		1			1)	3
	Y		1				S Large	Autos	
	IPC	U S N			А	Small Autos	S Smal	I Autos	
* M	ixed 🕕 Unknowr	Standard 📐 Negativ	ve Control						
Define and Set Up Standards				в	S Large Autos	S Large	Autos		
						1	1		
Assign sam	Assign sample(s) to the selected wells.					S Large Autos	S Large	Autos	
Assign	Sample	2				Small Autos 1	Smal	I Autos	
	Sample	• 1		:		S Large Autos	S Large	Autos	
					D	Small Autos	Smal	I Autos	
					Е	Small Autos	S Smal	Autos	
Assign sam	ple(s) of sele	cted well(s) to biolo	gical group.			1	1		

11. Выбрать повторы калибровочных образцов St1, задать концентрацию 50 и присвоить название Standard 1.

Assign targ	et(s) to the se	elected wells.			<	V	iew Plate Lay	out	View W	/ell Ta
Assian	Target	Task	Quantity		>					
	Large Autos			50		C	Show in Wells	•	🔢 View Leg	gend
	Small Autos			50			1		2	
	Y		5	0.0				S Lar	2 Autos	
	IPC					A	Small Autos	Sma	all Autos	
Mixed U Unknown S Standard N Negative Control				ļ	_					
کمبر Define and Set Up Standards						в	Small Autos	E Larg	e Autos	
Assign sample(s) to the selected wells.							S Large Autos	r S Larg	je Autos	
Assign	Sample					C	Small Autos	Sma	all Autos	
	Standard	1			1	0	Large Autos	S Larg	je Autos	
	Standard	2				ľ	Small Autos	Sma Sma	all Autos	
	Standard	3		$\overline{}$			S Large Autos	<mark>S</mark> Larg	je Autos	
						ļΕ	· · · · · ·	<u>.</u>		

12. Задать концентрации для остальных калибровочных образцов **St2-St5** в следующем порядке: 5; 0,5; 0,005. Присвоить названия калибровочным образцам **St2-St5**:

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





13. Под калибровочными образцами St отметить отрицательные контрольные образцы ПЦР – N. Присвоить им название NC.

Assign targ	et(s) to the se	lected wells.			K	∼	iew Plate Layout View Well Tat
Assign	Target	Task	Quantity		ľ	_	
\checkmark	Large Autos						Show in Wells 🔻 📲 View Legend
	Small Autos	U S 🛛				Г	1 2 3
	Y					F	S Large Autos
	IPC					A	Small Autos
M Define	and Set Up Stand	S Standard Negativ	e Control			в	S Large Autos S Small Autos S Small Autos
Assign sam	ple(s) to the s	elected wells.				с	Small Autos
	Standard	4		^	:	D	S Large Autos S Small Autos S Small Autos
Assign sam		ted well(s) to biolo	nical group	~		E	S Large Autos S Small Autos S Small Autos
Assign	Biologic	al Group	<u></u>			F	Large Autos Small Autos

14. Выделить оставшиеся лунки плашки.





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



16. В графе выбора референсного красителя указать «МР».

Assign san	ple(s) to the selected wells.	
		1
Assign	Sample	
	Standard 1	
	Standard 2	
	Standard 3	
Assign san	ple(s) of selected well(s) to biological group.	
Assign	Biological Group	
Soloot the	dvo to uso as the passive reference	J
Select the	dye to use as the passive reference.	
None 🗸		
ROX		
		_
MP		
None		_

17. Перейти на вкладку «Run Method».





18. Установить следующие параметры ПЦР.



19. Кликнуть по иконке «Save» и в открывшемся списке выбрать «Save As Template».



20. В появившемся окне выбрать папку «config», а в ней – папку «templates». Сохранить шаблон под названием «RealQuant H3».

Save As	emplate		\times
Save in	config		
Недавние документы Рабочий стол Документы Документы Документы Зтот колтютер	data eclipse logs portal-data prefs templates		
- 🍼 - I	File name:	RealQuant H3	/e
Сеть	Files of type:	Experiment Document Template files (*.edt) Can	cel

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



4.2.2. Установка шаблона для режима

Актуальную версию готового Шаблона можно получить по запросу от производителя набора. Перед началом работы Шаблон необходимо скопировать в папку «templates» программы **HID** или **7500 Software**, установленной на компьютере (например, локальный диск C/Applied Biosystems/.../config/templates).

4.2.3. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3

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



Последующие шаги идентичны как для программы **HID**, так и для программы **7500 Software**: 1. В открывшемся списке кликнуть по иконке **«Template»**.





2. В открывшимся окне выбрать шаблон «RealQuant H3» и нажать «open».

Set Up	Run	Analyse
Design Wicard	Constant Consta	Analyse Experiment
Templote	Barting Image: Series The name: The name: The series The series The series	Active P

3. В открывшемся шаблоне необходимо добавить кол-во исследуемых образцов.

 HID Real-Time PCR Analysis Softw File Edit Instrument Analysis New Experiment • 2 Open. 	vere-Version 1.2 Assays Tools Help 📕 Save ▾ 🎬 Close 🌆 Export ▾ 🤮	Print Report				- D
Experiment Menu «	Experiment: Untitled		Туре	Standard Curve	Reagents: TaqMan@ Reagents	START RUN ≽ 😢
Setup	Define Targets and Samples	Assign Targets and Sample	5			
Experiment Properties	Instructions: Define the targets to quarticity of the targets	ntify and the samples to test in the react	on plate.		Define Samples	
Plate Setup	Add New Target Add Saved Target	Save Target Delete Target			Add New Sample Add Saved Sample Save Sample Delete San	ple
Run Method	Target Name	Reporter	Quencher	Celour	Sample Name	Color
Reaction Setup	Large Autosomal Small Autosomal	TANRA	V None		Sample 1	×
🌱 Materials List	Y	FAM	~ None	~ - ~		
Run	PC	ROX	V None	× <mark>-</mark> ×		
Analysis						
/						
	Define Biological Replicate Group	15				
	Instructions: For each biological replic	cate group in the reaction plate, click Add	d Biological Group, then define th	e biological group.		
	Add Biological Group Delete Biological	al Group	Outer		Ormunate	
	Biological Group Name		Color		Comments	
u						Assign Targets and Samples
A Home K RealQuant H3.edt ×	x					

4. Перейти на вкладку «Assign Targets and Samples».



RealQuant H3

а на	Real-Time	PCR	Analysis Software	Version 1.2

HD Real-Time PCR Analysis Softw. File Edit Instrument Analysis	are - Version 1.2 Assays Tools Help					-	• •
🔄 New Experiment + 🍯 Open.	. 🛃 Save - 📫 Close 🌆 Export 🗎	Print Report					
Experiment Menu «	Experiment: Untitled		Тур	e: Standard Curve	Reagents: TaqMan@ Reage	ITS START RUN)	•
Setup	Define Targets and Samples	Assign Targets and Sampl	es				
Experiment Properties	Instructions: Define the targets to quan	NV and the samples to test in the read	tion plate.		Define Samples		_
Plate Solog	add New Tartet and Saved Tarret	Rave Terret Delete Terret			Add New Sample Add Sample Bars Sample Delet	Comelo	
Run Method	Total from target	Busiter Colores Colores	10	Color.	Areat time	(many	_
	Large Autosomal	TANRA	v None	v Start v	Sample 1	Cater	~
Keaction Setup	Small Autosomal	vic	~ None		1		
🛒 Materials List	Y.	FAM	~ Nona	2	111		
Pun Pun	IPC .	ROX	v None	•			
Analysis							
	Define Biological Replicate Group				5 C.		
	Instructions: For each biological replic	ate group in the reaction plate, click A	dd Biological Group, then define	the biological group.			
	Add Biological Group Delate Diclogica	r Group					
	Biological Group Name		Color		Comments		
1						Assign Targets	and Samples
+ Home RealQuant H3.edt ×							

5. Отметить расположение исследуемых образцов на плашке.

HID Real-Time PCR Analysis Softw File Edit Instrument Analysis	are - Version 1.2 Assays Tools Help		- 6
🔛 New Experiment 🔹 🚰 Open.	🚽 Save 👻 🖆 Close 🏼 🏘 Export 👻 Print Report		
Experiment Menu «	Experiment: Untitled	Type: Standard Curve Reagents: TaqMan@ Reagents	START RUN 🍺 🕐
Setup	Define Targets and Samples Assign Targets and Samples	Imples	
Experiment Properties	Unstructions: To set up standards: Click "Define and Set Up Standards." To set up unknowns: Select wells, assign target(s), select To set up negative controls: Select wells, assign target(s),	J" (Unknown) as the task for each target assignment, then assign a sample. Hen select "IV (Negative Control) as the task for each target assignment.	
Plate Setup	Assign target(s) to the selected wells.	View Plate Layout View Well Table	
Run Method	Assign Target Task Quantity	Select Wells With: - Select item Select item	
Reaction Setup	Small Autos	Show in Wells V Provide Legend	
🛒 Materials List			9 10 11 12
Run		A S Small Adds S Small Adds U S	Large Autos U Large Autos U Large Autos Small Autos U Small Autos U Small Autos U Small Autos
Analysis	Mixed U Unknown S Standard Negative Control Thy Define and Set Up Standards	B Starpe Anton. S Large Anton. U Lar	Large Autos. U Large Autos. U Large Autos. U Large Autos. Small Autos. U Small Autos.
	Assign sample(s) to the selected wells. Assign Sample	C C Starge Ades. 3 Large Ades. U Seat Ades. U S	Large Autos. U Large Autos. U Large Autos. Small Autos. U Small Autos. U Small Autos.
	Sample 1	D StargeAdes. N LargeAdes. U	Large Autos. U Large Autos. U Large Autos. Small Autos. U Small Autos. U Small Autos.
	Assign sample(s) of selected well(s) to biological group.	E Starp Adex. Starp Adex. Utarp Adex. Utar	Large Autos U Large Autos U Large Autos Small Autos U Small Autos U Small Autos
	Assign Biological Group	r Nape Adms. Nape Adms. U sape Adms. U Same Adms. U Sam	Large Autos U Large Autos U Large Autos U Large Autos Small Autos U Small Autos U Small Autos
		0 Large Ades. U Seal Ade	Large Autos. U Large Autos. U Large Autos. U Large Autos. Small Autos. U Small Autos. U Small Autos.
	Select the dye to use as the passive reference.	U Carge Addity U	Large Autos U Large Autos U Large Autos U Large Autos Small Autos. U Small Autos. U Small Autos.
		Wells: 🚺 96 Unknown 🔀 10 Standard 🔝 2 Negative Control	0 Empty
Home RealQuant H3.edt >			



6. Применить название исследуемого образца.



7. Очистить лунки без исследуемых образцов, выделив их и нажав правую кнопку мыши и выбрать «Clear».





8. Нажать клавишу «START RUN».

Setup					Type: Sta	ndard Curve		teagen	s. raq	Marrey I	teager	its		STARTR	UN IS	
	Define T	argets and S	amples	Ass	ign Targe	ts and Samples							_			
Experiment Properties	Q Instructio	To set up s To set up u To set up u	tandards nknowns egative co	Click "Defin Select well introis: Sele	e and Set Up s, assign targi ct wells, assig	Standards." et(s), select "U" (Unknown) gn target(s), then select "N") as t	ne task for gative Cont	each targe rol) as the	tassignn task for e	nent, then ach target	assign a	sample.			
Plate Setup	Assign ta	irget(s) to the	selecte	ed wells.	<	View Plate Layo	ut	View	well Tal	alc						
Run Method	Assign	Target	Task		Quantit			Select W	ells With:	- Select	tem - 💌	- Select	ltem - 💌			
Practice Setue	23	Large Auto				O Show in Wells V	-	View L	egend							d B
nadcavni Sonap	10	Small Auto				1 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Materials List	13	Y				Stare Stare										
Run		Mixed 🛄 Unkno	wn 🔝 St	andard 🔝 N	legative Con	A Small Small										
Analusia	AF Det	ine and Set Up St	andarda			B Starp Starp										
Analysis	Assign s	ample(s) to th	e selec	ted wells.	<i>4</i> .					-						
	Assign	Sam	nie			C Sheat Start										
	1	Sam	ple 1		1											
		11.201				D Small Small										
						Starp Starp										
	Assign sa	ample(s) of se	lected	well(s) to	biological	C Small Small										
	Assign	Biolo	gical Grou	ip.		, N Large N Large										
						Cartan Cartana		-	-	-		-				-
						O U Large U Large										
	Select th	e dve to use :	as the n	assive re	ference											

9. В появившемся окне выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «Save». Прибор начнет работу.

Setup Experiment Properties Parket Market M		ITART RUN		Man® Reagents	Reagents: Tac	dard Curve	Type: Star		nt: Untitled	Experimen	xperiment Menu «
Experiment Properties Parket Selfery Rus Method Rus Method Ractors Selfery Market Selfery Rus Method Selfer Linge Auto Selfer Linge Auto<						s and Samples	Assign Target	amples	Targets and Sa	Define T	Setup
Plais sate Ras Mathod Reaction Setup Katerials List Run Analysis Assign Target(s) to the selected wells. View Plate Layout View Well Table Setect Wells Wit: Select Item · · Select Item · · Select Item · · · Select Item · · · · Select Item · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			ample.	et assignment, then assign a s e task for each target assignm	as the task for each targ (Negative Control) as th	tandards." (s), select "U" (Unknown) target(s), then select "N	Define and Set Up t wells, assign targe Select wells, assig	andards: Clin knowns: Sel gative contro	To set up st To set up un To set up n	Instruction	Experiment Properties
Run Method Reaction Setsp Materials List Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analysis Run Analys				ble	ut View Well Ta	View Plate Layo	ells. <	selected	arget(s) to the	Assign ta	Plate Setup
Reaction Setup Reaction Setup Reterrate List Run Analysis Save in egetiments Comparative CI Example.eds Genotyping Exam			em - 💌	- Select Item - 💌 - Select I	Select Wells With		Quantit	Task	Target	Anning	Run Method
Carciton Setup Image: Superior Setup <td></td> <th></th> <th></th> <td></td> <td>View Legend</td> <td>O Show in Wells</td> <td></td> <td></td> <td>Large Auto</td> <td>(Cash)</td> <td></td>					View Legend	O Show in Wells			Large Auto	(Cash)	
haterials List Save In: experiments experiments Run Save In: Comparative CI Example eds a sds 7500tast-calib-puredye Analysis Presence Absence Example eds a sds 7500tast-calib-puredye Assign Presence Absence Calib-background 90,05-22-2019-03538 eds a sds 7500tast-calib-puredye Assign Presence Absence Points-Calib-background 90,05-22-2019-04542 eds a sds 7500tast-calib-puredye Assign Assign a sds 7500tast-calib-puredye a sds 7500tast-calib-puredye Assign Assign a sds 7500tast-calib-puredye a sds 7500tast-		10	0			and the second value of th	(m)	imile		10	eaction Setup
Run Analysis Asigni Asigni<	1 12	10	9		- 000	and the second se	ota	- experie	Save		laterials List
Analysis				Ofast-calib-puredve	3 sds75		five Ct Example.eds	Compa	Save in	-	Dun
Analysis Asign Persitie # Standard Curve Example eds a 505 *5000ast-call-puredy Asign Persitie # Standard Curve Example eds a 505 *5000ast-call-puredy Asign Persitie # Standard Curve Example eds a 505 *5000ast-call-puredy Asign Persitie # Standard Curve Example eds a 505 *5000ast-call-puredy Asign Persitie # Standard Curve Example eds a 505 *5000ast-call-puredy Asign Persitie # Standard Curve Pice Pice Pice Pice Pice Pice Pice Pic				Ofast-calib-puredye	2 sds75	4	ng Example.eds	a Genoty		The De	Run
Assign Assign				Ofast-calib-puredye	a sds75	as ple.eds	Standard Curve Example.	a Presen	документы	_	Analysis
Assign Padowak creat addr500fast-calib-background-90_c5-22-2019-044339.eds addr500fast-calib-background-90_c5-22-2019-044339.eds addr500fast-calib-background-90_c5-22-2019-04139.eds addr500fast-calib-background-90_c5-22-2019-04139.rds addr500fast-calib-background-90_c5-22-2019-04139.eds addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-background-90_c5-22-2019-04139.rds addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-background-90_c5-22-2019-011310 eds addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-background-90_c5-22-2019-014310 eds addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy+09-67-50_c7-2-2019-014523.eds addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy+09-67-50_c7-2-019-06172.dd addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy+09-67-50_c7-2-019-06172.dd addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy+09-67-50_c7-2-019-051051.eds addr500fast-calib-puredy addr500fast-calib-puredy mm mm mm t texm Files of type: Experiment Document Single files (* eds) Cancel				Ofast-calib-puredye	eds 2 sds75 eds 3 sds75	1-96_05-22-2019-033804 1-96_05-22-2019-035749	last-calib-backgroun last-calib-backgroun	2 sds750 2 sds750		Assign	
Assign Keenaerep Assign Keenaerep Assign Keenaerep Keena				Ofast-calib-puredye	eds al sds75	-96_05-22-2019-04453	ast-calib-backgroun	a sds750	Рабочий стол	Assign	
Assign As				Ofast-calib-puredye	eds a sds75	-96_05-22-2019-05355	ast-calib-backgroun	a sds750			
Assign As				Ofast-calib-puredye	eds alsds75 Deds alsds75	-96_07-24-2019-044110 -CY3_05-23-2019-01381	last-calib-backgroun last-calib-puredye-96	a sds750	Ман		
Assign Assign				Ofast-calib-puredye	3.eds al sds75	-CY5_05-23-2019-01452	ast-calib-puredye-9	a sds750	Документы		
Assign diad7500fast calb-pure/ye-06-FAM_07-24-2019-051051.eds as 3637500fast calb-pure/ye (Hename: File name: File sof type: Experiment Document Single files (*.eds) Cancel				Ofast-calib-puredye	Deds a sds75	FAM_05-23-2019-11201	last-calib-puredye-9	a sds750		Assign	
Assign File name: Sever Cere Files of type: Experiment Document Single files (* eds) Cancel Select the dye to use as the passive reference.				Ofast-calib-puredye	1.eds als75	FAM_07-24-2019-0510	tast-calib-puredye-96	2 sds750	Компьютер		
Cera Files of type: Experiment Document Single files (* eds)				Save			1	File name:	6	Assign	
Select the dye to use as the passive reference.				- Cancel		ent Single files (*.eds)	Experiment Docur	Files of type	Сеть		
Select the dye to use as the passive reference.								_			
Select the dye to use as the passive reference.							_				
H						н	e reference.	s the pass	ie dye to use a	Select th	
										MP 💌	

Home 🔚 Untitled X 🔚 Untitled [2] ×



4.3. Заполнение названия образца в шаблоне Exel

Для быстрого заполнения названия исследуемых образцов в программном обеспечении амплификатора 7500 можно воспользоваться шаблоном Exel (предоставляется производителем набора).

1. Открыть Exel шаблон «Заполнение плашки RQ».

2. Указать калибровочные образцы St в ячейках согласно их положению в лунках приготовленной плашки.

Файл	Главная	Вставка	Разметка стр	аницы Формулі	ы Данные I	Рецензирование	Вид Справка	🖓 Что вы хот	ите сделать?				
Вставит Буфер об	ж т з	аћота К. <u>К. Ч</u>	 14 14 		■	Переносить текс Объединить и по ыравнявание	т оместить в центре 🔹	Текстовый		Условное Форм матирование - как Стили	атировать Стили габлицу - ячеек -	Вставить Удали	Карана Кар Карс Карана Карана Карана Карана Карана Карана Карана Кара
D8		×	√ fx										
A A B	с		D	E	F	G	н	1	L	к	L	м	N
1							RealQ	uant					
2	1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3 A	Standard	1 5	tandard 1										
4 B	Standard	2 5	tandard 2										
6 D	Standard	4 5	tandard 4										
7 E	Standard	5 S	tandard 5										
8													
9 G													
11													
12													
13			Pei	акционная смес	њ (10 реакци	й)			Std1		D 1.07		
14	3 E. DC TA				110.00						днк че	ловека	
15	2,5X PC TP	12+			110,00	μι (+10%)			Std2		10 µl Std1 + 90	µI ДНК-буфер	
10	CITS HNA-T	PC			110.00	ul (±10%)							
18	CHO HINA-1				110,00	μι (+1070)			Std3		10 µl Std2 + 90	µI ДНК-буфер	
19	20 µl Реакц	юнной см	еси + 2 µI ДНК						Child		10.010000.00	of mure Golden	
20									504		10 µi 5005 + 90	рі днк-оуфер	
21	Имя файл	a 29-1	11-2021 test						Std5		10 ul Std4 + 90	ul ДНК-буфер	
22	_	RWN	файла без рас	ширения									
23	Папка	D:V	pplied Biosy	stems\7500\exp	periments\								
24		NN 8	папки для сохр	ранения файла. Па	апка должна суц	цествовать!							
25													
27	Выбр	ать пап	ку для		Сохранит	ь файл для							
28	сохра	пнения d	айла		импорта (s HID RT sw							
29													
30													
38													
20	0	tifiles Trie											
	Quan	urnering	<u> </u>							1			

3. Согласно положению в лунках приготовленной плашки указать названия образцов.

Файл Главная Вставка Разметка страницы Фор	мулы Данные Рецензирование Ви,	д Справка 📿 Что вы хо	отите сделать?			
	🗏 📰 🗞 - 🛛 ab Переносить текст	Текстовый	\sim	📮 📰 🖡	🚽 🖶 🏲 🚺	Σ-
Вставить 💞 Ж К Ц - 🗄 - ⊘ - А - ≡	🚍 🗏 🛃 🔛 Объединить и помести	ить в центре 👻 🍄 🔹 % осо	€.0 ,00 Усло ,00 →.0 Форматия	вное Форматировать С рование ткак таблицу тяч	тили Вставить Удалить Формат	¢ v
Буфер обмена 🕞 Шрифт 🕞	Выравнивание	га Число	rs i i i i	Стили	Ячейки	
C10 \rightarrow : $\times \checkmark f_x$						
A B C D E	F G	н	J	K L	MN	
1		RealQuant				
2 1 2 3	4 5	6 7	8	9 10	11 12	
3 A Standard 1 Standard 1						
B Standard 2 Standard 2 Standard 3						
6 D Standard 4 Standard 4						
7 E Standard 5 Standard 5						
8 F 36-1						
9 G 30-Z						
11						
12						
13 Реакционная с	смесь (12 реакций)		Std1			
14			5001	Ļ	НК человека	
15 2,5x PC TM2+	132,00 µl (+10%)		Std2	10 µl Std	1 + 90 µl ДНК-буфер	
17 СПЗ hNA-IPC	132,00 µl (+10%)		Std3	10 µl Std	2 + 90 µl ДНК-буфер	
			Std4	10 µl Std.	3 + 90 µl ДНК-буфер	
21 Имя файла 29-11-2021 test						
22 имя файла без расширения			Stas	10 µi Sta	4 + 90 µї днк-оуфер	
23 Папка D:\Applied Biosystems\7500	\experiments\					
24 Имя папки для сохранения файл	а. Папка должна существовать!					
25						
26						
27 Выбрать папку для	Сохранить файл для					
28 сохранения файла	импорта в HID RT sw					
30						
37						
38						
				E 4		



4. Указать имя файла в соответствующей строке.

Файл	Главная Вста	авка Разметка с	траницы Форму	илы Данные	Рецензирование	Вид Справка	Q Что вы хот	ите сделать?				
Встави Буфер о	Таһота Тъ	∨ 14 ∨ Ч ~ ⊞ ~ ⊘ Шрифт		: : : : : : : : : : : : : : : : : : :	 Френосить текст Объединить и по Зыравнивание 	r местить в центре 🕞	Текстовый	У форма	словное Форм птирование - какт Стили	атировать Стили габлицу - ячеек -	Етавить Удали Ячейю	х ть Формат х
C10	×	$\checkmark f_x$										
AB	С	D	E	F	G	н		J	К	L	м	N
1	1	2	2	4	5	RealQ	uant 7	0	0	10	11	12
2 3 A	I Standard 1	Z Standard 1	3	4	2	0	/	8	9	10	11	12
4 B 5 C	Standard 2 Standard 3	Standard 2 Standard 3										
6 D	Standard 4	Standard 4										
7 E	Standard 5	Standard 5										
9 G	36-2											
10 H												
11												
13		Р	еакционная см	есь (12 реакци	ій)			Chall.				
14					·			501		ДНК че	повека	
15	2,5x PC TM2+			132,00	0 µl (+10%)			Std2		10 µl Std1 + 90) µІ ДНК-буфер	
17	CII3 hNA-IPC			132,00	0 µl (+10%)			Std3		10 µl Std2 + 90) µІ ДНК-буфер	
18	20 µl Реакционно	й смеси + 2 µl ДH	к					Std4		10 ul Std3 + 90) ul ДНК-буфер	
20	1440 daŭes -	20.11.2021 tor										
21 22		29-11-2021 tes имя фаила beз pa	сширения					Std5		10 µl Std4 + 90) µl ДНК-буфер	
23	Папка	D:\Applied Bios	systems\7500\e	xperiments\								
24		Имя папки для со	хранения файла.	Папка должна су	ществовать!							
25												
26	Выблать	папку для		Сохрания	ь файл для							
28	сохранен	ия файла		импорта	e HID RT sw							
29												
30												
38												
	OuantiFile	rTrio 🕘							1.4			

5. Выбрать папку для сохранения данных.

Файл	Главная	Вставка	Разметка с	траницы	Формулы	Данные І	Рецензирование	Вид Справка	Q Что вы хот	гите сделать?				
Вставит Буфер об	ыт К К К К К К	ићота КК<u>Ч</u>	✓ 14 ✓ - Ш ~ Шрифт	A A • <u>A</u> •		≫r - eb ≪ ≥ E	Переносить текс Объединить и по	ст оместить в центре 👻	Текстовый • % 000 число	↓	Условное Форм матирование - как Стили	атировать Стили габлицу - ячеек -	Етавить Удали Ячейки	х Формат ть Формат
C10	-	X	√ fx											
AB	С		D	E		F	G	н	1	J	к	L	м	N
1								RealQu	iant					
2 3 A 4 B 5 C 6 D 7 E 8 F 9 G 10 H 11 12 13 14 15 16 6 7 7 E 7 7 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 Standard Standard Standard Standard 36-1 36-2 2,5x PC TM	1 S 2 S 3 S 4 S 5 S	2 tandard 1 tandard 2 tandard 3 tandard 4 tandard 5 P	еакционн	ая смесь	4 (12 реакциі 132,00	5)) µl (+10%) µl (±10%)	6	7	8 	9	10 ДНК че 10 µl Std1 + 90	11 ловека и JI (НК-буфер	
18						102,00	μι (12070)			Std3		10 µl Std2 + 90	и ДНК-буфер	
19 20	20 µІ Реакци	юнной сме	еси + 2 µl ДН	к						Std4		10 µl Std3 + 90	µI ДНК-буфер	
21 22	Имя файла	а 29-1	11-2021 tes файла без ра	st асширения						Std5		10 µl Std4 + 90	и ДНК-буфер	
23	Папка	D:\A	pplied Bios	systems\7	500\exper	iments\								
24 25 26 27 28 29 30 37 38	Выбра сохра	Имя ать папі інения ф	папки для со ку для райла	хранения ф	райла. Папк	а должна суц Сохранити импорта о	цествовать! ь файл для в HID RT sw							
	Quan	tiFilerTric	•								•			

6. В открывшемся окне выбрать папку для сохранения (для легкого доступа к файлам рекомендуется выбрать папку Applied Biosistems\7500\experiments).

- 7. Нажать клавишу «Сохранить файл для импорта в HID RT sw».
- 8. Закрыть шаблон Exel «Заполнение плашки RQ».
- 9. В программе HID либо открыть режим «Quantifiler Trio», либо открыть шаблон «Real Quant

H3» следуя пункту 4.2.3 Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3.

10. В верхнем меню выбрать «File» \rightarrow «Import».



HID Real-Time PCR Analysis Software - Version 1.2

File	Edit Instrument Ar	nalysis As	ssays Tools Help								
	New Experiment New Study	>	🚽 Save 🗸 📋 Clos	e 🔊 Export 🗸 🚪	Print Report.						
l	Open Close	Ctrl+O	xperiment: Ur	titled				Ту	pe: Stand	lard Curve	
1	Save Save As	Ctrl+S	Define Target	s and Samples	Assign T	argets and S	amples				
	Save As Template	Ctrl+T	Instructions: D	efine the targets to qu	antify and the sa	mples to test in th	e reaction plate.				
	Import		Define Targets								
	Export										
	Create Slide		Add New Target	Add Saved Target	Save Target	Delete Target					
	Print										
	Print Report		Target Name			Reporter		Quencher		Colour	
	Exit		Large Autosomal			TAMRA	~	None	~		\sim
			Small Autosomal			VIC	~	None	~		~
Ä	Materials List		Y			FAM	~	None	~		~
	Run		IPC			ROX	~	None	\sim		~
Gu.	Analysis										

11. В открывшемся окне нажать **«Browse»** и выбрать сохранённый в шаблоне Exel файл данных. Import Plate Setup ×

Select the plate setup file to import, then click "Start Import."	0
Select File:	Browse
Start)	mport Cancel

- 12. Нажать клавишу «Start Import». Файл данных загрузится в программу HID.
- 13. Убедиться в корректности расстановки образцов в плашке и их названии.
- 14. Нажать клавишу «START RUN».

15. В появившемся окне выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «Save». Прибор начнет работу.

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

4.4. Программное обеспечение QuantStudioTMDesign&Analysis

4.4.1. Создание шаблона эксперимента

- 1. Открыть программу **QuantStudio™ Design& Analysis**.
- 2. Кликнуть по иконке «Создать эксперимент».

Новый эксперимент	Открыть эксперимент
+	*
Создать эксперимент 🗸 🗸	Открыть

3. В открывшейся вкладке «Свойства» в графе «Название» написать имя шаблона – «RealQuant H3».



л Редак Анализ Н	астро Справ	
войства Протоко	л Планшет Запуск Результаты Экспортир	
Свойства экспер	римента	
Название	RealQuant H3	
Штрихкод	Штрихкод — дополнительно	
Имя пользова	Имя пользователя — дополнительно	
Тип прибора	QuantStudio™ 5 System	,
Гип блока	96-луночный блок с лунками по 0,2 мл	
Гип экспериме	Стандартная кривая	
² еактивы	Реагенты TaqMan®	

- 4. В правом нижнем углу нажать кнопку Далее
- 5. Во вкладке «Протокол» установить следующие параметры циклограммы:

	Свойства	Протокол П.	паншет	Запуск Р	'езульта	ты Экспортир	
	Протоко	л эксперимен	іта				
		Объем		Крышка			
		22 µL		105,0 °C			
		Стадия удеря	кания		Стадия	пцр	
		95,0 02:0	°C 0 1.0	95,0 ° 6 °C/s 00:09	¢ □	1.6 *C/s	
	\langle	1.6 *C/s				60,0 °C 00:30 ô \$	
		Шаг1		Шаг1		Шаг2	
					40 🜲] x	
авом нижнем уг.	лу нажа	ать кнопк	y	Далее			

БСИНТО

7. В открывшейся вкладке «Планшет» в пункте «Быстрая настройка» в графе «Пассивный референсный краситель» из выпадающего списка выбрать краситель «MUSTANG PURPLE».

п Редак Анализ Настр	о Справ	
войства Протокол	Планшет Запуск Результаты Экспортир	
	4 65220 H	
азначить мишени	и ооразцы	
Быстрая настройка	Расширенные настройки	
Атрибуты лунок		
Образец	Новый образец	
Мишень	Новая мишень	
Комментарии к лу	Комментария К лункам	
Атрибуты планшета		
Пассивный рефер	MUSTANG PURPLE	
	ROX	
	MUSTANG PURPLE	
	Her	
	ABY	
	CM_DYE	
	CY5	
	FAM	
	JUN	

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

_	N	Іишени			- [+ Добавить		Действие	,
		Название	Репортер	Гаситель		Комментарии	Задача	Количество	
		Target 1	FAM	NFQ-MGB			~		×
		Target 2	FAM	NFQ-MGB			~		×
		Target 3	FAM	NFQ-MGB			~		×
_	0	бразцы				Н Добавить		Действие	`
			Название образца			Комментарии			+
		Sample 1							

9. Обозначить мишени и выбрать для них соответствующие красители.

Б	ыстр	ая настройка	Расширенные настройки					
-	- 1	Иишени			+ Добавить		Действие	*
		Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество	
		Large Autosomal	TAMRA	None		~		×
		Small Autosomal	VIC	None		~		×
		Y	FAM	None		~		×
		IPC	ROX	None		~		×



10. В разделе «Образцы» к Sample 1 добавить еще пять образцов, кликая по «Добавить».

-	Μ	ишени			Н Добавить		Действие		*
		Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество		
		Small Autosomal	VIC	None		~		×	c
		γ	FAM	None		~		×	¢
		IPC	ROX	None		~		×	c
-	0	бразцы			🕂 Добавить	Ø	Действие		~
			Название образца		Комментарии			+	
		Sample 1							

11. Переименовать образцы в Standart 1, 2, 3, 4, 5 и NC.

-	Обр	азцы	🕂 Добавить 📝 Действи	ie v
		Название образца	Комментарии	+
		Standart 1		
		Standart 2		
		Standart 3		
		Standart 4	1	
		Standart 5	1	
		NC	1	

12. Расположить калибровочные образцы (стандарты) St в плашке и значить мишени.

Бы	страя	я настройка 🛛 🖡	расширенные настройки							🝥 Прос	мотр 🗸
-	М	ишени			Н Добавить	📝 Действие	v	<u>ו</u> ר		1	2
		Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача Количество			А	U Large Au	U Large Au.
		Large Autosomal	TAMRA	None		U ~	x				
		Small Autosomal	VIC	None		U ~	x		в	U Small Au.	U Small Au.
		γ	FAM	None		U ~	×			🚺 Large Au	🚺 Large Au.
-	0	бразцы			+ Добавить	📝 Действие	*			U Small Au	Small Au.
			Название образца		Комментарии		+		D	Large Au	Large Au.
		Standart 1				-				Large Au.	Large Au.
		Standart 2							E	U Small Au	Small Au .
									F	Large Au	🚺 Large Au.
-	Б	иологические групп	ы повторностей			Н Добавит	ъ		Ĺ	U Small Au.	U Small Au.



13. Отметить калибровочные образцы как стандарты S по всем мишеням, кроме IPC. Для мишени IPC – оставить U.

Быс	трая і	настройка	Расширенные настройки						_ `	۲	Просмотр
-	Ми	шени			🕂 Добавить	📝 Деі	йствие	v	ן ר	1	2
		Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача Коли	чество			A S Larg	e Au <mark>S</mark> Lar Il Au <mark>S</mark> Sm
2	s	Small Autosomal	VIC	None		S ~ 1.0		×			≤ 2
~	Y	(FAM	None		S ~ 1.0		×		B	e Au <mark>S</mark> Lar Il Au <mark>S</mark> Sm
2		PC	ROX	None		U ~		×			
-	Обр	разцы			Добавить	🖍 Деі	йствие	*		C S Sm	II Au S Sn
			Название образца		Комментарии			+			e Au 🧕 Lar Il Au 🧕 Sm
		Standart 1								S Larg	e Au. <u>S</u> Le
		Standart 2								S Sm	ll Au <mark>S</mark> Sm
										- S Lar	e Au. 🛐 La
_	Бис	ологические гру	ипы повторностей			+ 4	Іобавит	ъ		Sma	II Au Si Sin

14. Выбрать повторы калибровочных образцов St1, задать концентрацию 50 и присвоить название Standard 1.

Быст	трая настройка	Расширенные настройки					< 💿 Просм	лотр
-	Мишени			+ Добавить	📝 Действие	*	1	2
	Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача Количество		A S Large Au.	S Large /
\checkmark	Large Autosomal	TAMRA	None		S ~ 50.0	×		
~	Small Autosomal	VIC	None		S ~ 50.0	×	B S Small Au	S Small /
\checkmark	Y	FAM	None		S ~ 50.0	×	S Large Au	S Large (
-	Образцы			+ Добавить	📝 Действие	*	S Small Au.	S Small
		Название образца		Комментарии		+	D S Large Au.	S Large
	Standart 1					1	S Large Au	S Large
	Standart 2						E Small Au	S Small
								_

15. Задать концентрации для остальных калибровочных образцов **St2-St5** в следующем порядке: 5; 0,5; 0,005. Присвоить названия калибровочным образцам **St2-St5**:

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



16. Под калибровочными образцами **St** отметить отрицательные контрольные образцы ПЦР – **N**. Присвоить им название NC.

Быс	трая настройка	Расширенные настройки					< <	🕞 Просмотр
-	Мишени			🕂 Добавить	📝 Действие	*		
	Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача Количество		A	Large Au.
~	Small Autosomal	VIC	None		N ~	×		
~	Y	FAM	None		N ~	×	в	Large Au. S Small Au. S
~	IPC	ROX	None		U ~	×		Large Au. S 1
_	Образцы			+ Добавить	📝 Действие	*		Small Au.
		Название образца		Комментарии		+	D	Large Au. S I Small Au. S S
~	NC					I		≤ 2
	Standart 1						E	Small Au. S 1
-	_							
_	Биологические го	ИППЫ ПОВТОРНОСТЕЙ			+ Добави	ть		Small Au.

17. В верхнем меню выбрать «Файл» → «Сохранить как».

Фай	п Редак	Анализ	Настро	Справ			
	Новый экс	перимент			>		
	Открыть				Ctrl+O		
	Закрыть						
	Сохранить				Ctrl+S		
	Сохранить	как					
	Сохранить как закрытый шаблон						
	Преобразовать эксперимент в шаблон						
	Импортировать планшет						
	Создать с	лайд					
	Печать						
	Печать от	чета					
	Выход						

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

Save Save				\times
Save in:	Templates	Y	1	
Недавние документы Рабочий стол	384 Well 96 Well			
Документь				
_				
Этот компьютер				
	File name:	RealQuantH3 edt		<u>S</u> ave
Сеть	Files of type:	Файлы с шаблонами протоколов анализа (*.edt)	~	Cancel

19. Нажать «Save» для сохранения шаблона.

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



4.4.2. Установка шаблона

Актуальную версию готового Шаблона можно получить по запросу от производителя набора. Перед началом работы Шаблон необходимо скопировать в папку templates программы **QuantStudio Design & Analysis Software**, установленной на компьютере (например, локальный диск C/Applied Biosystems/templates).

4.4.3. Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3

1. Открыть программу QuantStudio Design & Analysis Software.

2. В центре экрана, в разделе «Новый эксперимент» выбрать «Создать эксперимент» → «Шаблон».



3. В открывшемся окне выбрать шаблон RealQuant H3 и перейти на вкладку «Планшет» в пункт «Расширенные настройки».

Бы	стра	я настройка	Расширенные настройки						\$	Прос
-	М	ишени			+ Добавить	📝 Дейс	твие	*	4	1
		Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача Колич	ество		A	S Large Au.
~		Large Autosomal	TAMRA	None		S ~ 50.0		×	Г	
~		Small Autosomal	VIC	None		S ~ 50.0		×	в	S Large Au.
\checkmark		Y	FAM	None		S ~ 50.0		×		
_	0	бразцы			Н Добавить	📝 Дейс	твие	~	C	S Smill Au
			Название образца		Комментарии			+	D	S Large Au.
_		Observations of					_		1	S Smill Au.
		Stanuart 4					-		Е	S Large Au.,

4. Добавить кол-во исследуемых образцов в разделе «Образцы».

-	Обр	азцы	Добавить Действие	~
		Название образца	Комментарии	•
		Standart 5		
		Sample 1	•	



5. Применить название исследуемого образца к конкретной лунке плашки.

101	грая н	настройка	Расширенные настройки							×.	🛞 Пр	осмот
	Ми	шени			+ Добавить		Действие	~			1	
		Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество			A	S Large 4	
	L	arge Autosomal	TAMRA	None		~		×			100	
	s	mall Autosomal	VIC	None		~		×		в	S Large #	u., S
	Y	,	FAM	None		~		×		с	S Large 4	
	Обр	азцы			+ Добавить		Действие	~			S Small 4	
			Название образца		Комментарии			+		D	S Carpe 4	s S
		Sample 1							I	:	Tipe S Jame 4	5
		Standart 1								5	S Small /	u. S
	Био	ологические гру	ипы повторностей				— Добави	ть		F	N Large A	
			Биологическая группа		Комментарии					G	Sample 1	

6. Назначить мишени для исследуемого образца.

Быс	тра	я настройка	Расширенные настройки						_ >	<u>ه</u> ۱	Іросмот
-	М	ишени			🕂 Добавить	ľ	Действие	*		1	
		Название	Репортер	Гаситель	Комментарии	Задача	Количество		,	Large	Au. S
I		Large Autosomal	TAMRA	None		U ~		×		100	
2		Small Autosomal	VIC	None		U ~		×	'	3 Sindle	Aun S
∠		Y	FAM	None		U ~		×			Au. 5
-	0	бразцы			+ Добавить		Действие	*		S Small	Au. S
			Название образца		Комментарии			+	t		
		NC					-				
		Sample 1					-				
		Standart 1								Small	

7. Перейти на вкладку «Запуск» и нажать клавишу «Начать прогон».

8. В появившемся окне выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «**Save**». Прибор начнет работу.

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



5. АНАЛИЗ ДАННЫХ

5.1. Программное обеспечение НІД в режиме «Quantifiler Trio»

5.1.1. Обработка результатов

1. Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **HID**.

2. Кликнуть по иконке «Standard Curve» во вкладке Analysis.



3. Во всплывшем окне, в графе **Target**, последовательно открыть калибровочную прямую для каждой мишени.



- 4. Убедиться, что параметры каждой калибровочной прямой соответствуют значениям: коэффициент корреляции (R²)> 0.99;
 - наклон калибровочной прямой от -3,3 до -3,6.



ВНИМАНИЕ!!! Корректное определения концентрации ДНК в исследуемых образцах возможно только при соответствии параметров калибровочных прямых требуемым значениям.



5. Перейти к анализу данных в разделе «View Well Table»

6. Оценить значения в столбце Quantity и Ст Mean по каждой мишени (T.Small autosomal,

T.Large autosomal, **T.Y**, **T.IPC**) для каждого исследуемого образца в соответствии с пунктом 6 Интерпретация результатов.

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

Расчет индекса деградации ДНК в образце осуществляется по формуле:

Концентрация мишени Small autosomal (нг/мкл)

Концентрация мишени Large autosomal (нг/мкл)

и рассчитывается автоматически. Значение индекса деградации находится в столбце «Mean Degradation Index».

Половая принадлежность определяется наличием или отсутствием амплификации фрагмента Y-хромосомы. Проанализировать значения C_T мишени T.Y в таблице «View Well Table». Наличие значений C_T ≤35,0 говорит о присутствии мужской ДНК в образце, отсутствие сигнала или C_T >35,0 о женской ДНК.

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

Мужская ДНК: женская ДНК = $\frac{Y (HГ/MКЛ)}{Y (HГ/MКЛ)}$: $\frac{(S.a. (HГ/MКЛ)-Y (HГ/MКЛ))}{Y(HГ/MКЛ)}$

где Y (нг/мкл) – концентрация мишени Y, S.a. (нг/мкл) – концентрация мишени Small autosomal.

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

Оценка ингибирования определяется по значению C_T внутреннего положительного контроля – T.IPC. Значения C_T для T.IPC исследуемых образцов не должны превышать значения C_T для T.IPC отрицательного контроля (NC) более чем на 2 цикла: $C_T \leq C_T \text{ NC}+2$. Получение значений, превышающих значение C_T для T.IPC отрицательного контроля (NC) более чем на 2 цикла: (NC) более чем на 2 цикла ($C_T > C_T \text{ NC}+2$) будет свидетельствовать о наличии ингибиторов в образце ДНК.

Если по основным мишеням (**T.Small autosomal**, **T.Large autosomal** и **T.Y**) сигнал не детектируется, а по **T.IPC** сигнал есть, но его значение $C_T > C_T NC+2$, или если сигнал не детектируется ни по основным мишеням (**T.Small autosomal**, **T.Large autosomal** и **T.Y**), ни по **T.IPC**, необходимо развести образец ДНК в 5, 10 и 15 раз, а затем снова провести ПЦР-РВ для оценки степени ингибирования и концентрации ДНК.

5.1.2. Виртуальная калибровочная кривая

В программном обеспечении HID версии 1.3 при работе в вкладке «Quantifiler Trio» предусмотрена возможность сохранения параметров калибровочной кривой (создание так называемой «Виртуальной калибровочной кривой») с возможностью их применения к образцам из других постановок ПЦР в реальном времени.

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

5.1.2.1. Создание виртуальной калибровочной кривой

 Убедиться, что параметры сохраняемой калибровочной прямой соответствуют значениям: - коэффициент корреляции (R²)> 0.99;



- наклон калибровочной прямой от -3,3 до -3,6.
- 2. Записать значения Y-Intercept и Slope для калибровочной кривой каждой мишени.

3. Перейти в раздел «Virtual Standard Curve» и кликнуть по клавише «AddVirtual Curve to Experiment»

Setup	Virtual Standard Curve
Run	Add Virtual Standard Curve to Experiment
Analysis	Virtual Standard Curve
Mamplification Plot	
Standard Curve	
Virtual Standard Curve	
STR Kit Setup	
Multicomponent Plot	
Raw Data Plot	
QC Summary	
Multiple Plots View	

4. В открывшемся окне нажать «New»

Virtual Standard Curve 🗸			Apply Filter Remove Fil
New	Delete All Export		
/irtual Standard Curve	Comments	Created On	Last Modified

5. Затем в графе «Virtual Standard Cuve» ввести название стандартной кривой. Например: RealQuant 031023 (где цифры означают серию наборов, к которым применима данная виртуальная кривая). В разделе «Targets» ввести значения Y-Intercept и Slope для калибровочной кривой каждой мишени

Create New Standa	ard Curve	×
Enter all the information for th OK to save.	ne new Virtual Standard Curve, then click	*= Required
Virtual Standard Curve *	RealQuant 031023	
Is Standard Curve Default	?	
Expiration Date *	31.01.2024 🗸	
Select Kit *	Quantifiler Trio 🗸 🗸	
Targets * T.Y Y-Intercept 0.0 Slope: 0.0	Y-Intercept: 0.0 Slope: 0.0	
T.Small Autosomal Y-Intercept 0.0 Slope: 0.0		
Reset Fields	ОК	Cancel

БСИНТО

6. Нажать «ОК» для сохранения калибровочной кривой.

Virtual Standard Curve Library

5.1.2.2. Применение виртуальной калибровочной кривой

1. Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **HID**.

2. Перейти в раздел «Virtual Standard Curve» и кликнуть по клавише «AddVirtual Curve to Experiment»



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

inter a filter query, then click "App Virtual Standard Curve 🗸 =	ly Filter."		Apply Filter Remove Filter
New Edit Delete	Delete All		
Virtual Standard Curve	Comments	Created On	Last Modified
RealQuant 031023		03.10.2023	03.10.2023
		Add selected Virtual Standa	rd Curve Exit Virtual Standard Curve Libra

ВАЖНО!!! Если планируется применение виртуальной калибровочной кривой для определения концентрации образцов использовать стандартные образцы для ПЦР в реальном времени не требуется. Для контроля точности определения концентрации рекомендуется один из стандартов амплифицировать в качестве образца.

5.2. Программное обеспечение HID в режиме «Custom Assay»

5.2.1. Обработка результатов

Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **HID** или **7500 Software**. Если файл открывается из программного обеспечения **HID**, перевести программу в режим «**Custom Assays**», кликнув по соответствующей иконке (см. п. 4.1.).

При анализе данных в программе **HID** или **7500 Software**, полученных с использованием набора «**RealQuant**» впервые, возможно несоответствие шкалы уровня флуоресценции (ΔRn) на



амплификационном графике уровню флуоресценции полученных данных, в результате чего кривые амплификации будут не видны. Для визуализации кривых амплификации необходимо:

7. Кликнуть по иконке «Plot properties».

mplification Plot		< [
Plot Settings		>
Plot Type: ARn vs Cycle V Graph Type: Linear V Color: Well V		Г
Save current settings as the default		L
	🔎 🔎 🖴 🍓 🛃 🚺	F
	Plot propert	tie

8. Во всплывшем окне выбрать **Y-Axis**.

Plot Prop	perties X
Gener	ral X Axis Y Axis
Title	
Text	Amplification Plot
Font	Arial, 11 Select
Colour	r 🔲 0, 0, 0 🗸
\checkmark	Show Title
	OK Cancel

9. В графе Maximum value установить значение 10 и нажать ОК.

Plot Pro	pertie	es				×			
Gene	əral	XA	kis	Y Axis					
Label				•					
Label	∆Rn								
Font	Sans	Serif.pla	ain, 12	2		Select			
Colour		0, 0, 0				\sim			
Tick Ma	irks								
\checkmark	Sho	w majo	r tick	marks					
\checkmark	Sho	w mino	tor tick marks						
\checkmark	Sho	w majo	r tick	mark labels					
\checkmark	Sho	w mino	r tick	mark labels					
Range									
		A	luto-a	adjust range					
Minimur	m value		-0,34	642726294	696335				
Maximu	m valu	e	10						
		(ок	Cancel					

Амплификационные кривые станут видны на амплификационном графике.

Оценить калибровочные образцы (St) и калибровочную прямую: 10. Кликнуть по иконке «Standard Curve» во вкладке Analysis.





11. Во всплывшем окне оценить параметры калибровочных прямых по каждой мишени в соответствии с п.6-7.



12. В графе Target последовательно открыть калибровочную прямую для каждой мишени.

S	Standard Curve											
(Plot Se	ttings										
	Target	All 🗸	Plot Color	Default	\sim							
	Sav	All	as the default									
l		Large Autosomal										
		Small Autosomal										
		Y										
		IPC										

- 13. Убедиться, что параметры каждой калибровочной прямой соответствуют значениям:
 - коэффициент корреляции (R²)> 0.99;
 - наклон калибровочной прямой от -3,3 до -3,6.

ВНИМАНИЕ!!! Корректное определения концентрации ДНК в исследуемых образцах возможно только при соответствии параметров калибровочных прямых требуемым значениям.

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



٢	View P	late La	you	View Well Table						
>				Select	Wells \	Nith: - Select	Item - 🗸 -	Select Item - 🗸		
			1						recomm recomm	
	Show in T	able 🔻	Gr	oup By 🔻		_			Expand All Collapse A	AII
				Target Name						
	# 🗘 We	ell Or	n	Sample Name		yes	Ст	Quantity		
	□ 1			Tock						^
	1 /	\1		Task		X-None	27,388			
	2 /	\1		Replicate		MRA-None	16,299	50		
	3 /	\1		Dve		C-None	19,286	50		
	4	\1		Dye		M-None	17,849	50		
	5 E	31		Flag		X-None	27,378	_		
	6 6	31	4	Ст		MRA-None	19,517	5		
	7 E	31	H			C-None	22,655	5		
	8 1	31		AMPNC		M-None	20,978	5		
	9 (21		Well Position (Row)		DX-INONE	27,604			
	10 0	21				MRA-None	23,389	0,5		
	12 (21		Well Position (Column)	L-None M None	20,992	0,5		
	12 0	21 D1		None		W-None	24,417	0,5		
	14 1	51		Stondart 4 Lorge Auto	оо Т		27,033	0.05		

15. Оценить значения в столбце Quantity и Ст по каждой мишени (Small autosomal, Large autosomal, Y) для каждого исследуемого образца в соответствии с пунктом 5.5. Интерпретация результатов.

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

Расчет степени деградации ДНК в образце осуществляется по формуле:

Концентрация мишени Small autosomal (нг/мкл) Концентрация мишени Large autosomal (нг/мкл)

Используя значения Quantity мишеней Small autosomal и Large autosomal из таблицы View Well Table.

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

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

Мужская ДНК: женская ДНК = $\frac{Y (HГ/MКЛ)}{Y (HГ/MКЛ)}$: $\frac{(S.a. (HГ/MКЛ)-Y (HГ/MКЛ))}{Y (HГ/MКЛ)}$

где Y (нг/мкл) – концентрация мишени Y, S.a. (нг/мкл) – концентрация мишени Small autosomal.

Использовать значения Quantity мишеней Small autosomal и Y из таблицы «View Well Table».

Оценка ингибирования установить значения C_T внутреннего положительного контроля – IPC. Значения C_T для IPC исследуемых образцов не должны превышать значения C_T для IPC отрицательного контроля (NC) более чем на 2 цикла: $C_T \leq C_T$ NC+2. Получение значений, превышающих значение C_T для IPC отрицательного контроля (NC) более чем на 2 цикла: (NC) более чем на 2 цикла ($C_T > C_T$ NC+2) будет свидетельствовать о наличии ингибиторов в образце ДНК.

Если по основным мишеням (Small autosomal, Large autosomal и Y) сигнал не детектируется, а по IPC сигнал есть, но его значение $C_T > C_T NC+2$, или если сигнал не детектируется ни по основным мишеням (Small autosomal, Large autosomal и Y), ни по IPC,

БСИНТО

необходимо развести образец ДНК в 5, 10 и 15 раз, а затем снова провести ПЦР-РВ для оценки степени ингибирования и концентрации ДНК.

5.2.2. Автоматическая оценка результатов

В случае использования программного обеспечения HID или 7500 Software для автоматического расчета степени деградации и разведения:

1. Нажать «Export».

File	Edit	Instrument	Analysis	Assays	Tools	Help			
	Vew Ex	periment +	道 Open	🛃 Sav	re 🕶 🚞	Close	🌆 Export 🗸	8	Print Report

2. В открывшемся окне присвоить файлу данных название и выбрать папку для экспорта.

1 E	Export Data	\times
I) ⁹	Select the type of data to export, select whether to export one file or separate files, then enter export file properties. (Optional) Click "Customise Export" to change the export format and to select fields to export. Click "Start Export" to export your data.	?
ſ	Export Properties Customise Export	
	Sample Setup Results	
	Select data to a senart in Raw Data Intuiticomponent Data	
	1. Select data to export	
	2. Select one file or separate files: One File v Select to export all data in one file or in separate files for each data type.	
	3. Enter export file properties:	
	Export File Name: Untilled_data File Type: 🐴 (* xks) 🗸	
	Export File Location: C/Applied Biosystems/hid v1.2experiments Browse	
ľ		
	Onen file/s) when export is committee	

3. Перейти на вкладку «Customise Export». В пункте «Select Results Content» оставить отмеченными ТОЛЬКО Sample Name, Target Name, Ст и Quantity. Нажать «Start Export».

			File Name: Unitited_data File Type:
e Data	Results Export		
	Sample N. Target No.	Ouentity	
Across Columns	Sample IV Target IVa	Ci Quantuty	
toguite Contont	Standart 1 IPC	27.388058 NaN	
cours content	Standart 1 Large Auto	10.29940 00.0	
esults Fields	Standart 1 V	17 849077 50.0	
	Standart 1 IPC	27.523172 NaN	
	Standart 1 Large Auto	16 588871 50 0	
nie Name	Standart 1 Small Auto		
pre rvanie	Standart 1 Y	17.499432 50.0	
et Name	2019_1788 IPC	27.70344 NaN	
	2019_1788 Large Auto	31.645811 0.00239	
c .	2019_1788 Small Auto	31.769445 0.00653	
	2019_1788 Y	32.2254 0.00140	
orter	2019_1810 IPC	27.764076 NaN	
nchor	2019_1810 Large Auto	o 31.373777 0.002860	
iciter	2019_1810 Small Auto	o 31.117876 0.01030	
	2019_1810Y	31.86774 0.001829	
	2019_1811 IPC	27.709969 NaN	
ean	2019_1811 Large Auto	31,80508 0.002073	
-	2019_1011	22 919997 0 105120	
D	2019_0872_IPC	27 701159 NaN	
otitu	2019_0872_Large Auto	35 975338 1 44131	
iuty 🗸	2019 0872 Small Auto	35 459618 4 95481	4
parator (Delimiter)	2019_0872Y	33.816536 4.379810	
	2019_0872 IPC	27.750883 NaN	
is Commas	2019 0872 Large Auto	33.80951 5.88221	
D ntity v parator (Delimiter)	2019_1811 Y 2019_0872 IPC 2019_0872 Large Auto 2019_0872 Small Auto 2019_0872 Y 2019_0872 IPC 2019_0872 IPC	32.818897 9.105120 27.701159 NaN 35.975338 1.441317 3.816536 4.379810 27.750883 NaN 33.80951 5.882210	

4. Открыть полученный файл Exel, 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».



5.3. Программное обеспечение QuantStudio Design& Analysis Software 5.3.1. Обработка результатов

1. Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение QuantStudio Design& Analysis Software.

2. Оценить калибровочные образцы (St) и калибровочную прямую.



3. Оценить параметры калибровочных прямых по каждой мишени в соответствии с п. 4-5. данной инструкции.



4. Нажать на клавишу «Параметры графика», последовательно открыть калибровочную прямую для каждой мишени.



Результаты

							_
•	Θ	J	-	1		1	6
					-0	1	-

5. Убедиться, что параметры каждой калибровочной прямой соответствуют значениям:

- коэффициент корреляции (R²)> 0.99;

- наклон калибровочной прямой – от -3,3 до -3,6.

ВНИМАНИЕ!!! Корректное определения концентрации ДНК в исследуемых образцах возможно только при соответствии параметров калибровочных прямых требуемым значениям.

6. В меню планшета справа выбрать данные списком.

• •

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

											Действие	~		Сохранит	ЬУ
0	🔊 Про	смотр	v		Групг	ировать по	~		_				(+		
#	Лунка	Названи	ıe	Hi	Название мишени ст Название образца Задача 77 Повторные измерения 10 Краситель 88				Ст	Количество					
1	A1			Y					57	50,000					
1	A1			IF					ю						
1	A1			L					68	50,000					
1	A1			s	Фла Ст	жок			50	50,000					
2	A2			Y	HIG	HSD			8	0,005					
2	A2			IF	Пол	южение лу	нки (строк	a)	n						
2	A2			L	✓ Нет	ожение лу	нки (столо	ец)	30	0,005					
2	A2			Sn	nall Aut	STANDA	VIC-None	32,0	69	0,005					
3	A3			Y		UNKNOWN	FAM-None	19,7	55	45,311					
3	A3			IP	С	UNKNOWN	ROX-None	23,8	97						
3	A3			La	rge Aut	UNKNOWN	TAMRA	18,0	58	52,944					
3	A3			Sn	nall Aut	UNKNOWN	VIC-None	18,8	61	43,020					
4	A4			Y		UNKNOWN	FAM-None	34,5	58	0,003					
4	A4			IP	С	UNKNOWN	ROX-None	25,9	25						
4	A4			La	rge Aut	UNKNOWN	TAMRA	33,0	78	0,002					

Оценить значения в столбце Quantity и Ст по каждой мишени (Small autosomal, Large autosomal, Y) для каждого исследуемого образца в соответствии с пунктом 5.5. Интерпретация результатов.

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

Расчет степени деградации ДНК в образце осуществляется по формуле:

Концентрация мишени Small autosomal (нг/мкл) Концентрация мишени Large autosomal (нг/мкл)

Использовать значения Quantity мишеней Small autosomal и Large autosomal из таблицы View Well Table.

SCNHTON

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

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

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

где Y (нг/мкл) – концентрация мишени Y, S.a. (нг/мкл) – концентрация мишени Small autosomal.

Использовать значения Quantity мишеней Small autosomal и Y из таблицы «View Well Table».

Оценка ингибирования установить значения C_T внутреннего положительного контроля – IPC. Значения C_T для IPC исследуемых образцов не должны превышать значения C_T для IPC отрицательного контроля (NC) более чем на 2 цикла: $C_T \leq C_T$ NC+2. Получение значений, превышающих значение C_T для IPC отрицательного контроля (NC) более чем на 2 цикла ($C_T > C_T$ NC+2) будет свидетельствовать о наличии ингибиторов в образце ДНК.

	and an effe				
Skip Empty Wells 🗹 Skip Off	itted wens				
Select Content					
- All Fields	Sample Na	Target Na	СТ	Quantity	
Well	Standard 1	IPC	27.712		
Well Position	Standard 1	Large Aut	18.421	50.000	
Omit	Ctandard 1	Small Aut	18 720	50.000	
✓ Sample Name	Standard 1	Sinai Aut	10.729	50.000	
✓ Target Name	Standard 1	Y	19.155	50.000	
Task	Standard 1	IPC	28.064		
Reporter					
Quencher	Standard 1	Large Aut	18.755	50.000	
√ст	Standard 1	Small Aut	18.543	50.000	
Ct Mean	Standard 1	Y	19.594	50.000	
Ct SD	Characterized D	me	20.110		
🗹 Quantity	Standard 2	IPC	28.118		
Quantity Mean	Standard 2	Large Aut	22.027	5.000	

Если по основным мишеням (Small autosomal, Large autosomal и Y) сигнал не детектируется, а по IPC сигнал есть, но его значение $C_T > C_T NC+2$, или если сигнал не детектируется ни по основным мишеням (Small autosomal, Large autosomal 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.



5.3.2. Автоматическая оценка

1. Нажать «Export».

🔒 QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4.3						1 1 - 61	×	
File Edit A	nalysis Tools	Help						
Properties	Method	Plate	Run	Results	Export			

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

Edit An	alveie Toole	Help					
Properties	Method	Plate	Run	Results	Export		
Export							Auto Export Export De Save
File Name		05-05-202	2			Content	_
File Type		QuantStuc	lio			Amplification Data	Raw Data
			10			Results	Melt Curve Raw Data
						Melt Curve Result	Reagent Information
Location		C:\Users\Us	ser\experiment	s	Browse	Customize Customize what is e	exported within each item above.
		🗹 Open ex	ported files whe	en complete		Options	
		(IUI Manual	export only)			Unify the above content into one file	2
						Unify the above content into one file Solit the above content items into in	adividual files

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

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

5. В исходном окне нажать «Export».

QuantStudio	o™ Design & Ar	nalysis Softwa	are v1.4.3					- 0	1 2
File Edit A	nalysis Tools	Help							
Properties	Method	Plate	Run	Results	Export				
Export						Auto Export	Export	□ _# Sav	e v

6. Открыть полученный файл Exel, 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».



6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице:

		Интерпретация результата								
Образец	VIC	TAMRA	FAM	ROX						
Образец	Small autosomal	Large autosomal	Y	IPC						
	Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев									
S4		1 <i>c</i>	<u>.</u>	Есть/нет	ПЦР-РВ прошла не корректно,					
51	нет кривои амі	плификации по люо	ои из мишенеи	кривои амплификации	амплификатором					
				Нат крирой	ПЦР-РВ прошла не корректно,					
NC	Нет	кривой амплифика	ции	амплификации	проблемы с реагентами или амплификатором					
NC	Есть кривая ампл	ификации ранее 35	цикла (Ст≤35,0)	Есть/нет кривой амплификации	Контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ					
	Результ	аты анализа не	подлежат учёту	для конкретной пробы						
	Нет	кривой амплифика	ции	Нет кривой амплификации						
				Кривая						
				амплификации	Ингибирование ППР-РВ					
	Нет	кривой амплифика	ции/	кривой						
Unknown	Есть кривая ампл	ификации после 35	цикла (Ст >35,0)	амплификации						
				NC на 2 и более						
			Есть кривая	E om /wom						
	Есть кривая ампли	фикации после 35	амплификации	сть/нет кривой	Ложноположительный					
	цикла (С	^T >35,0)	ранее 35 цикла (Ст≤ 35,0)	амплификации	результат					
	Результаты	анализа подлеж	ат учёту при по.	лучении следу	ющих данных					
				Кривая						
				амплификации	Набор реагентов специфичен в					
S4	Eag			опережает	отношении ДНК человека.					
51	ECI	ъ кривая амплифик	ации	кривую	работоспособности смеси.					
				амплификации NC (Ст <	результаты подлежат учету.					
				$C_{T NC}+2)$						
				Есть кривая						
NC	Нет кривой ампл	ификации/Есть кри	вая амплификации	амплификации в лиапазоне 25-	Контаминация отсутствует					
110	ПС	осле 35 цикла (Ст >.	35,0)	29 цикла						
				CT=25-29						
				амплификании						
				равна или	В пробе солержится ЛНК					
	Есть кривая амп	лификации ранее 3:	5 цикла (Ст≤35,0)	опережает	человека, ингибирование					
	-			кривую амплификании	отсутствует.					
				NC $(C_T \leq$						
				$C_{T NC}+2)$						
			Нет кривой	амплификании						
T T 1	_		амплификации/Ес	равна или						
Unknown	Есть кривая амп	лификации ранее $(C_{m} < 25)$	ть кривая	опережает	В пробе содержится ДНК					
	ээ цикла	(C1255,0)	после 35 цикла	амплификании	человека женского пола					
			(C _T >35,0)	$NC (C_T \leq C_T \times 2)$						
			Леградированн		l					
	Есть книрая	Нет крирой	Есть крирая	are cohundre						
	амплификации	амплификации/Е	амплификации		В пробе содержится					
	ранее $\overline{35}$ цикла	сть кривая	ранее $\overline{35}$ цикла	Кривая	мужского пола					
	(UT ≤ 35,0)	амплификации,	(UT ≤35,0)	амплификации						



RealQuant H3

Есть кривая амплификации ранее 35 цикла (Ст≤ 35,0)	Есть кривая мплификации анее 35 цикла (Cr≤35,0) Которая отстает от кривой амплификации мишени Small Autosomal более чем на 1 цикл (Cr >35,0)			В пробе содержитс деградированная ДНК человек женского пола				
Образцы с ингибиторами ПЦР								
Есть кривая амп	лификации ранее 35	5 цикла (Ст ≤35,0)	Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	В пробе содержится Д человека, мужского п ингибирование ПЦР-РВ	ДНК юла,			
Есть кривая амп 35 цикла	лификации ранее (Ст≤ 35,0)	Нет кривой амплификации/Е сть кривая амплификации после 35 цикла (Ст >35,0)	Кривая амплификации отстает от кривой амплификации NC на 2 и более циклов	В пробе содержится Д человека женского п ингибирование ПЦР-РВ	ДНК юла,			
		Нет ДНК че	еловека					
Нет кривой ампл пс	ификации/Есть кри осле 35 цикла (Ст >3	вая амплификации 5,0)	Кривая амплификации равна или опережает кривую амплификации NC (Ст ≤ Ст № +2)	В пробе отсутствует Д человека.	днк			

где St – калибровочный образец, NC – отрицательный контрольный образец ПЦР, Unknown – исследуемый образец.

Версия инструкции от 11.04.24

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