

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 Excel	22
4.4.	Программное обеспечение QuantStudio™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.

В таблице приведены мишени и используемые красители:

№	Мишень	Описание фрагмента	Краситель
1	Y	ДНК Y-хромосомы	FAM
2	Small autosomal	аутосомная ДНК, короткий фрагмент	VIC
3	Large autosomal	аутосомная ДНК, длинный фрагмент	TAMRA
4	IPC	внутренний положительный контроль	ROX

Пассивный референсный краситель – MP.

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»

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

1.2. Область применения

Набор может быть использован в лабораториях бюро судебно-медицинских экспертиз и в лабораториях экспертно-криминалистических центров. Результаты, полученные с использованием набора «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

№	Наименование	Состав	Объем	Количество		
				HG-403AB100	HG-403AB200	HG-403AB400
1	PC-RQAB	2,5x Реакционная смесь	1 мл	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки
2	СПЗ-RQAB	Смесь специфических праймеров и зондов	1 мл	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки
3	ДНК человека ♂	Стабилизированный раствор ДНК человека мужского пола в концентрации 50 нг/мкл	0,03 мл	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки
4	ДНК-буфер	Буфер для разведения ДНК человека	1,2 мл	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки
5	ОКО	Отрицательный контрольный образец, H ₂ O	0,2 мл	1 пробирка	2 пробирки	4 пробирки

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°C.

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

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-96x1,5 /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 реагентов «RealQuant H3» требуется калибровочная прямая, получаемая с помощью постановки в ПЦР-РВ калибровочных образцов. Для приготовления калибровочных образцов используется стабилизированный раствор ДНК человека мужского пола в концентрации 50 нг/мкл, входящий в состав набора.

1. Пробирки с ДНК человека, 50 нг/мкл (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:

Стандарт	Концентрация, нг/мкл	Объемы	Разведение
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 (РС) рассчитать требуемые количества реагентов РС-RQAB и СПЗ-RQAB исходя из таблицы и количества образцов:

Реагент	Расход реагентов	
	на 1 реакцию, мкл	рекомендуемое количество для N* образцов
РС-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.

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

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

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

3. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем **РС-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. Закрывать 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.

Рекомендуемый порядок следования образцов в приборе

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

где **St1- St5** – калибровочные образцы, **N** – отрицательный контрольный образец, **U** – исследуемый образец.

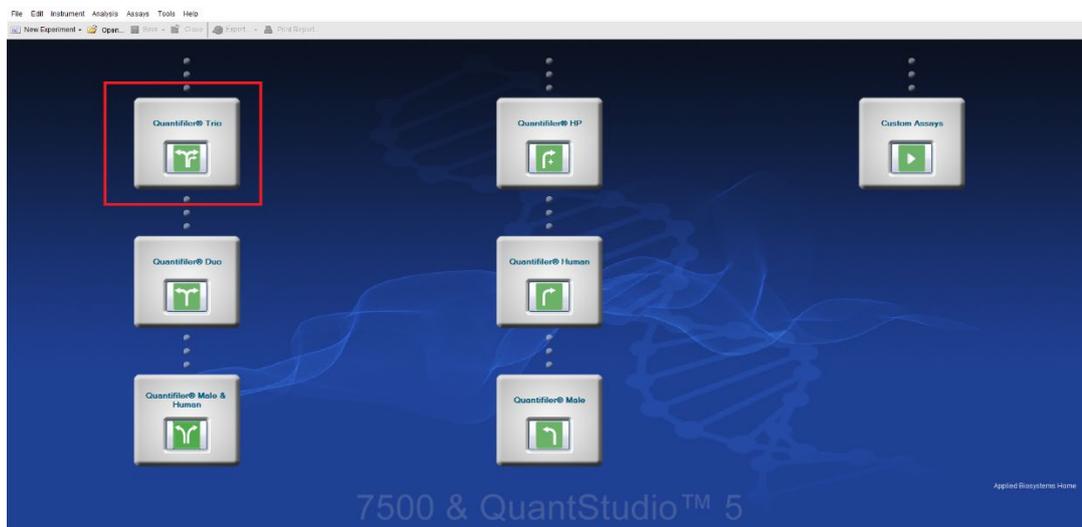
4. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1. Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio»

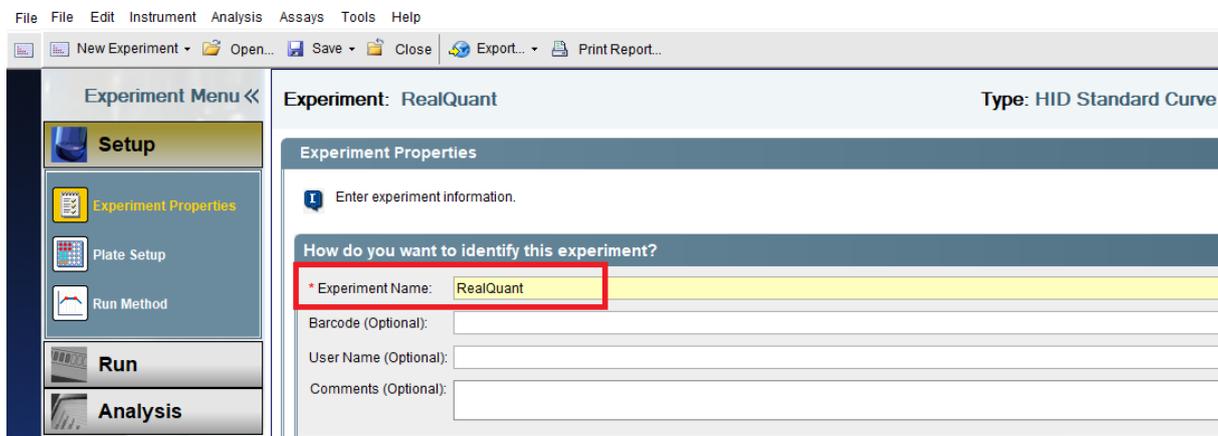
ВАЖНО!!! Использовать стандартный режим программного обеспечения HID возможно только в случае калибровки амплификатора спектральным калибратором – Spectral calibration RQ-AB7500 или QS5.

4.1.1. Запуск ПЦР-РВ

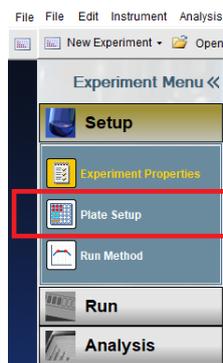
1. Открыть программу HID, кликнуть по иконке «Trio»



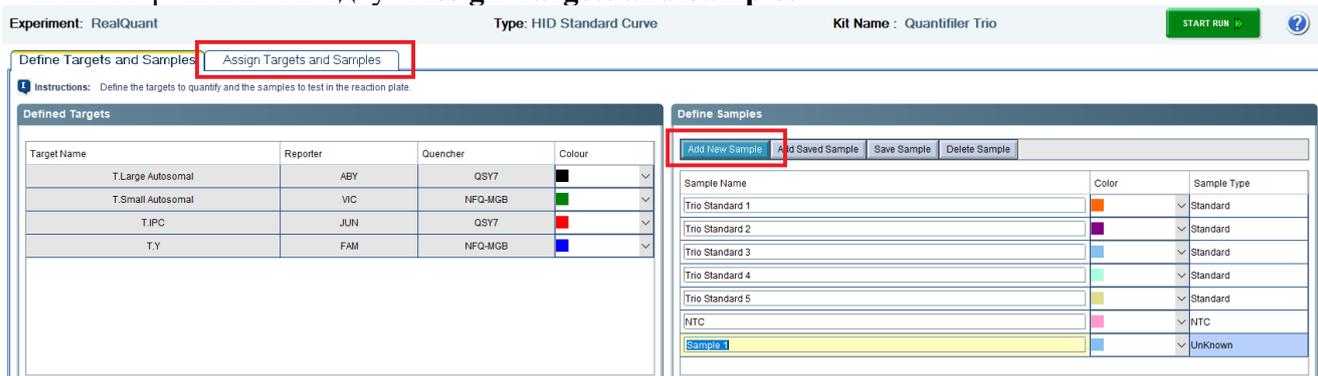
2. В открывшемся окне в графе «Experiment Name» задать имя эксперимента



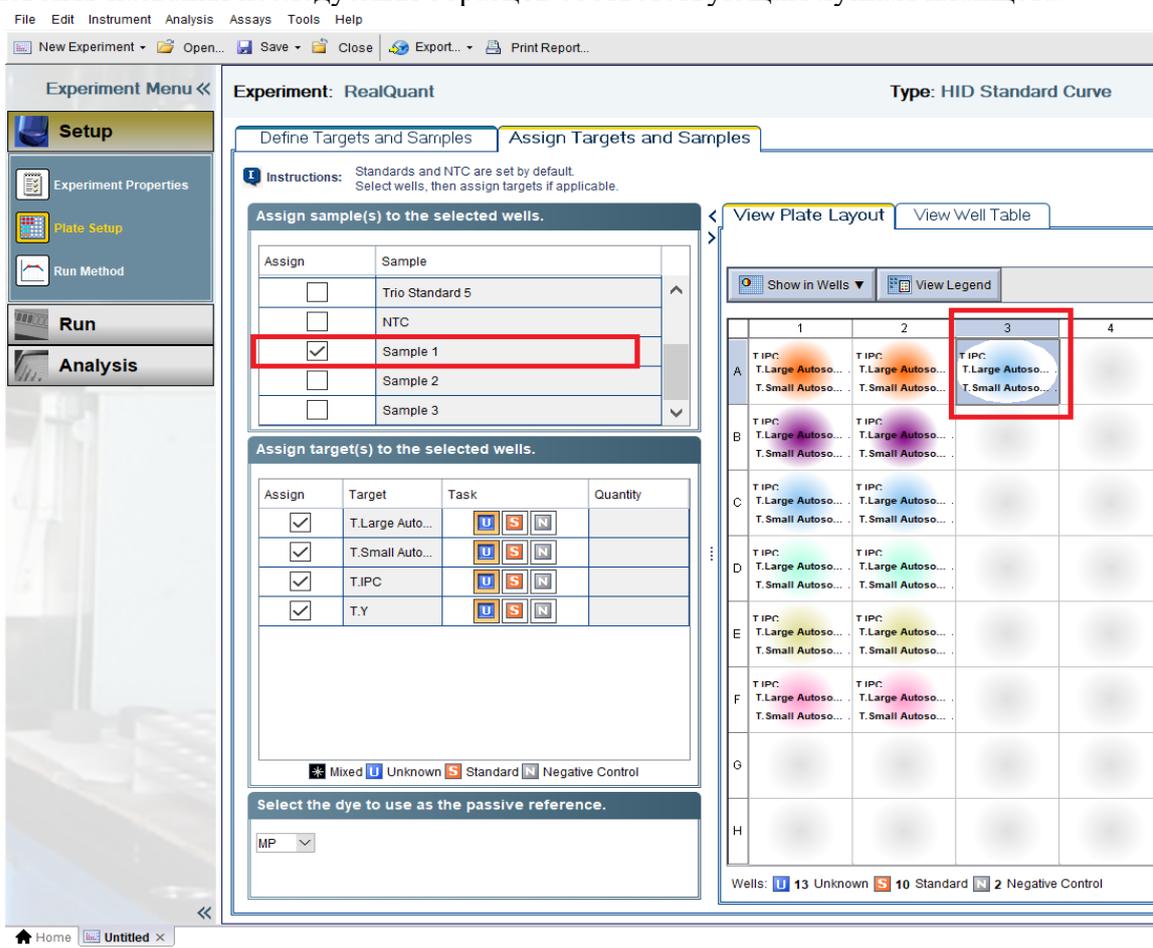
3. Перейти на вкладку «Plate Setup»



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



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



6. В правом верхнем углу нажать «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

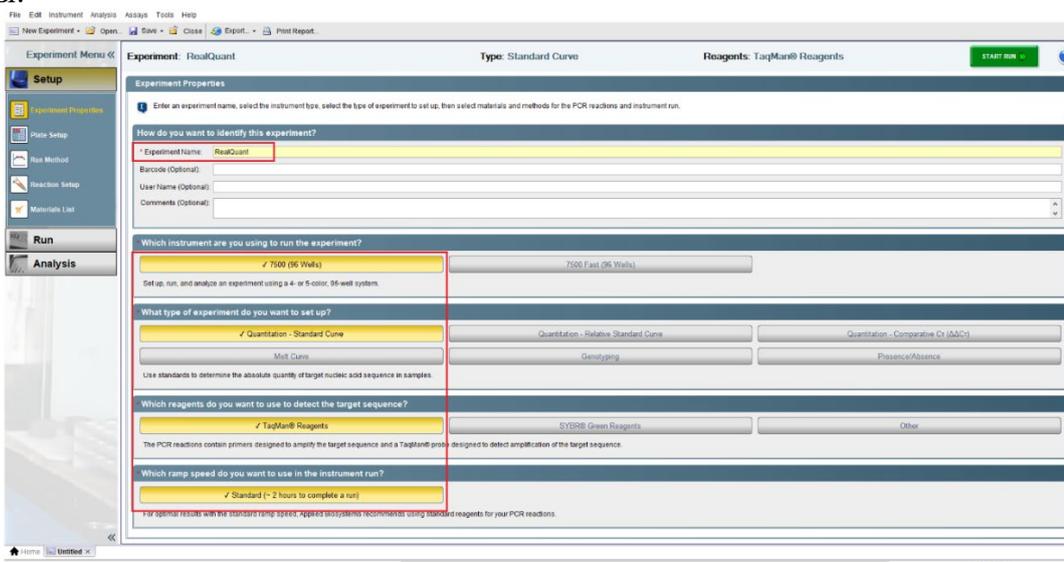
Для создания шаблона в программном обеспечении HID необходимо перейти в режим «Custom Assays», для чего открыть программу и кликнуть по соответствующей иконке.



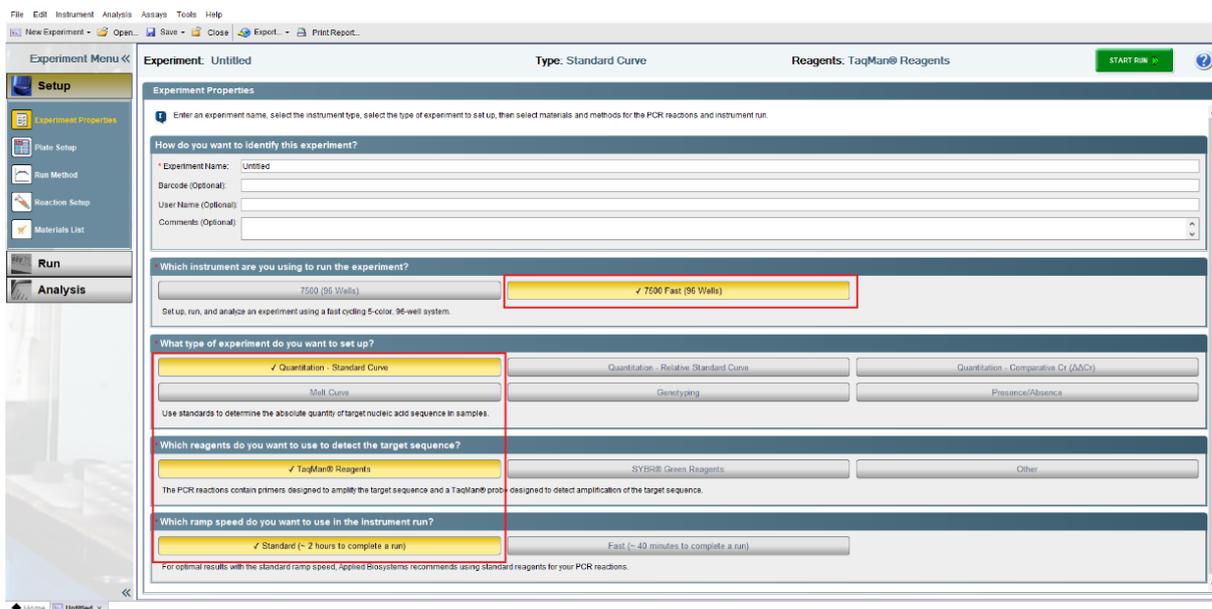
1. Кликнуть по иконке «Advanced Setup».



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



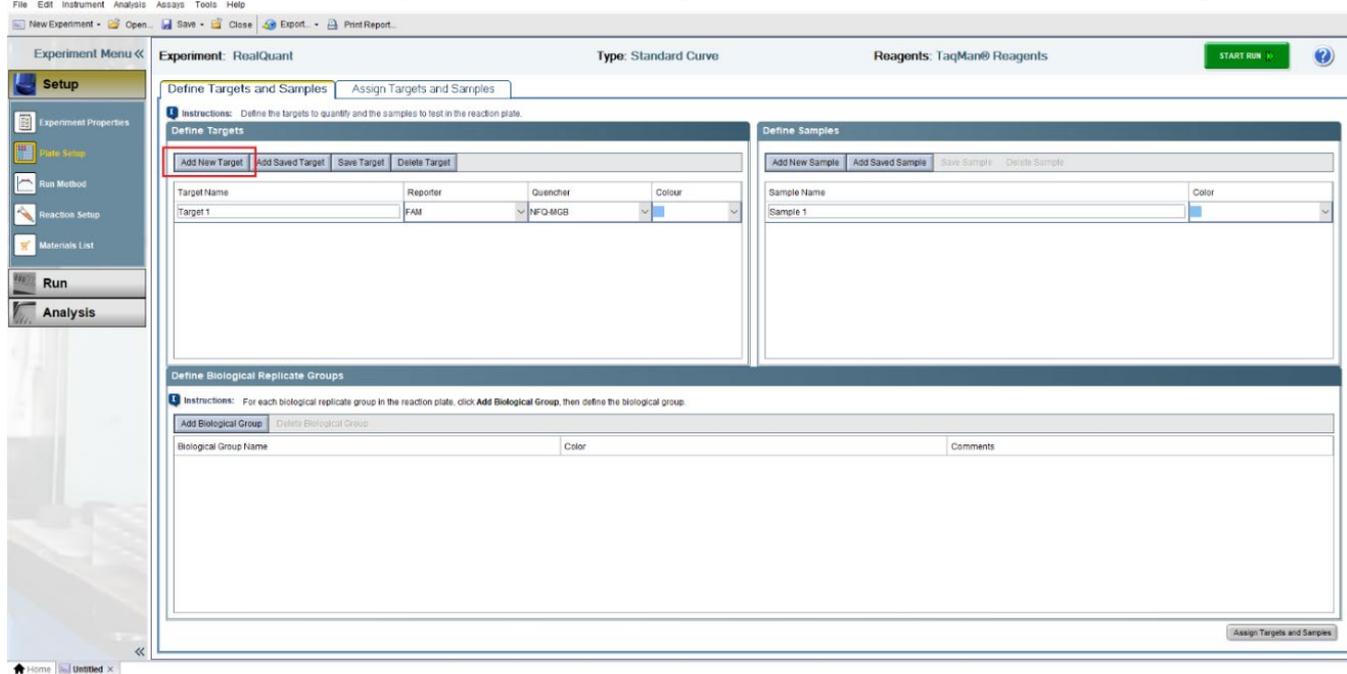
Для прибора 7500 Real-Time PCR System Fast:



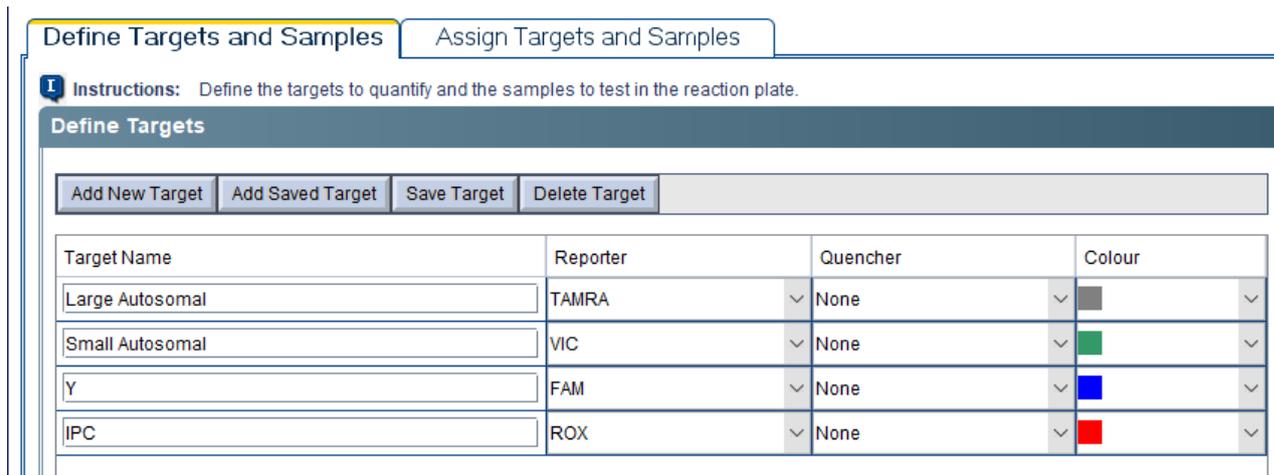
3. Перейти на вкладку «Plate Setup» в левой верхней части монитора.



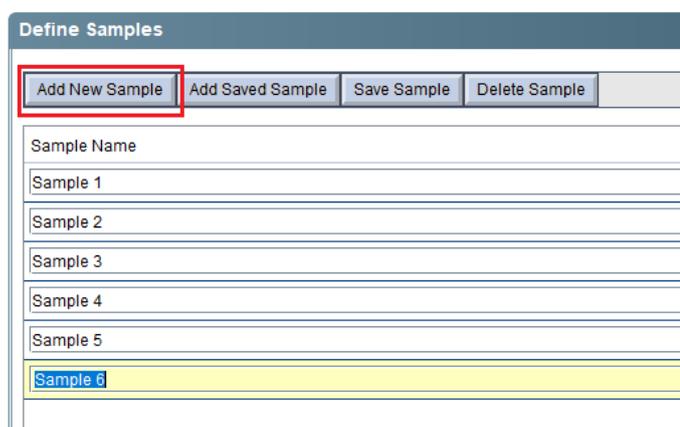
4. В отрывшемся окне во вкладке «Define Targets and Samples» в разделе «Define Targets» к существующей мишени (Target1) добавить еще три мишени, кликая по «Add New Target».



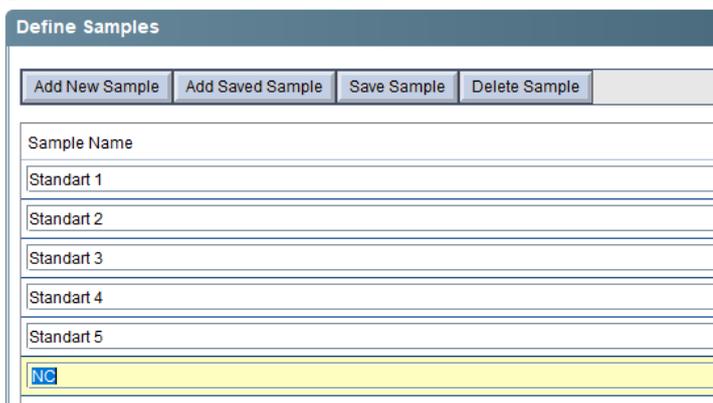
5. Обозначить мишени и выбрать для них соответствующие красители.



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



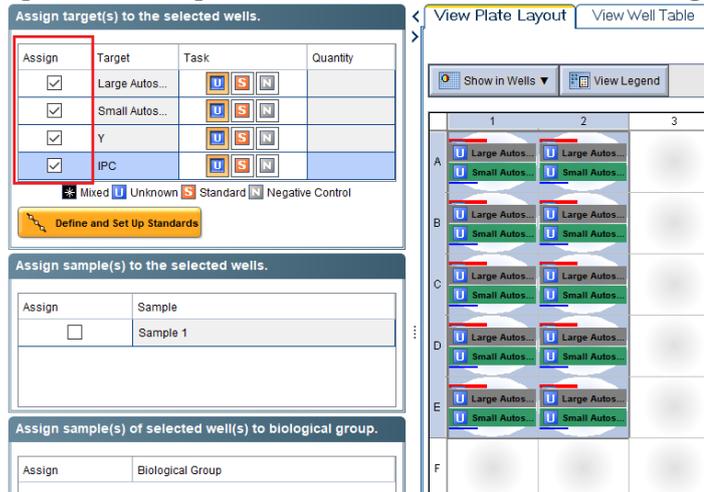
7. Переименовать образцы в Standart 1, 2, 3, 4, 5 и NC.



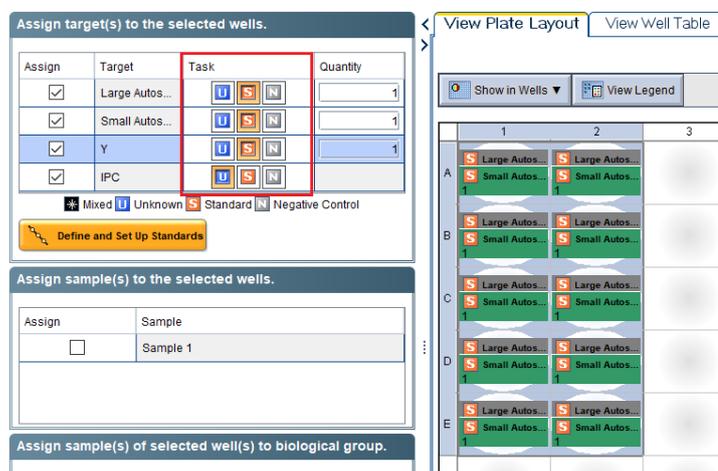
8. Перейти на вкладку «Assign Targets and Samples».



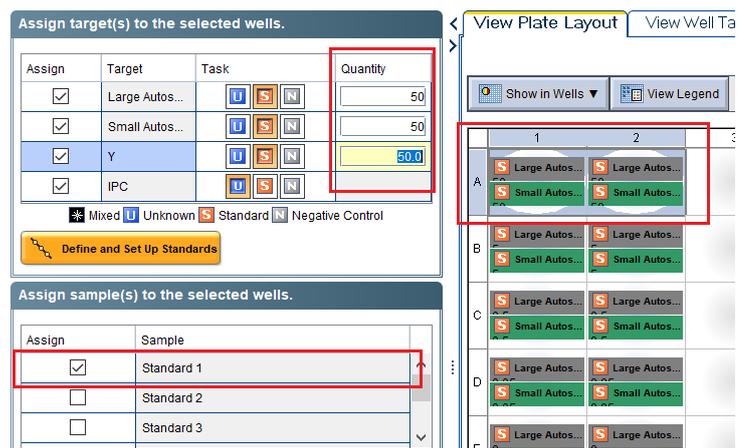
9. Расположить калибровочные образцы **St** в плашке и отметить «**Assign**».



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



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



12. Задать концентрации для остальных калибровочных образцов **St2-St5** в следующем порядке: 5; 0,5; 0,05; 0,005. Присвоить названия калибровочным образцам **St2-St5**:

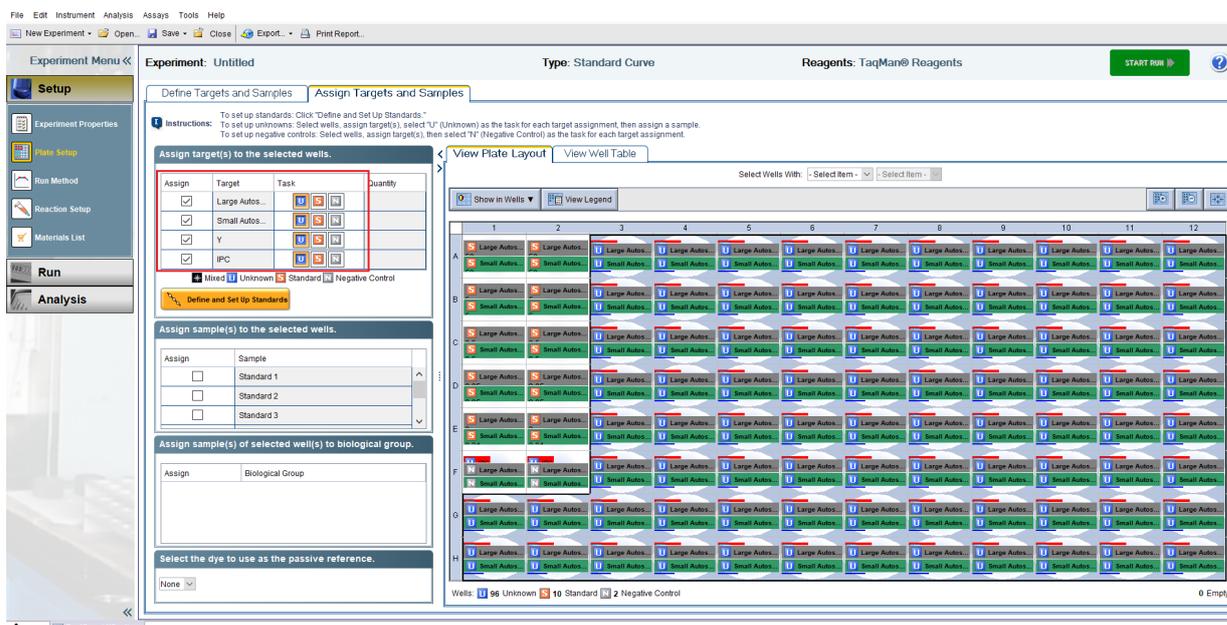
St2	Standard 2
St3	Standard 3
St4	Standard 4
St5	Standard 5

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

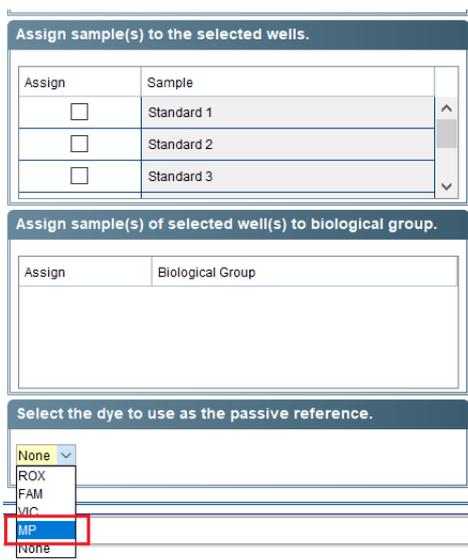
13. Под калибровочными образцами **St** отметить отрицательные контрольные образцы ПЦР – **N**. Присвоить им название **NC**.

14. Выделить оставшиеся лунки плашки.

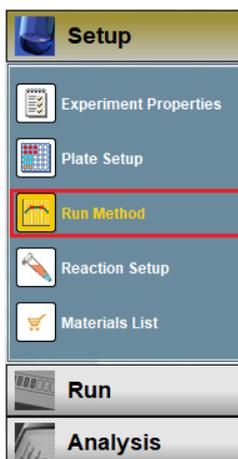
15. Отметить выделенные лунки в графе «Assign», а в графе «Task» выбрать U (исследуемые образцы) по всем мишеням.



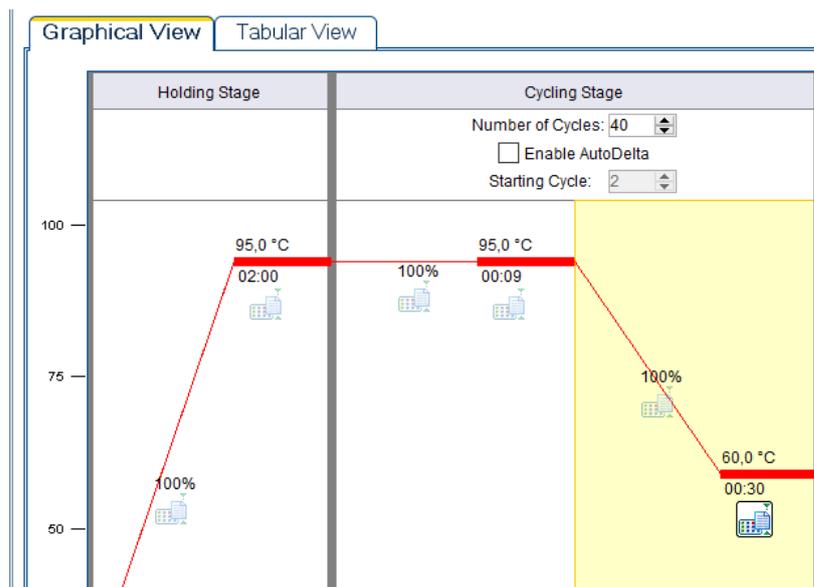
16. В графе выбора референсного красителя указать «MP».



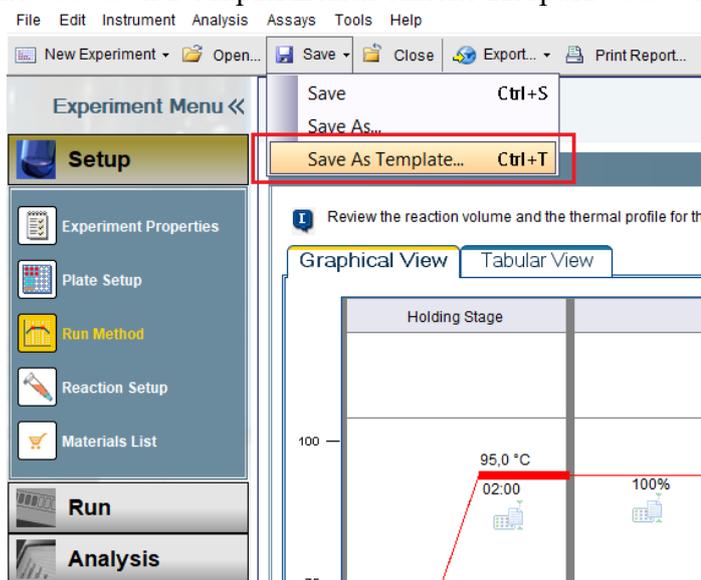
17. Перейти на вкладку «Run Method».



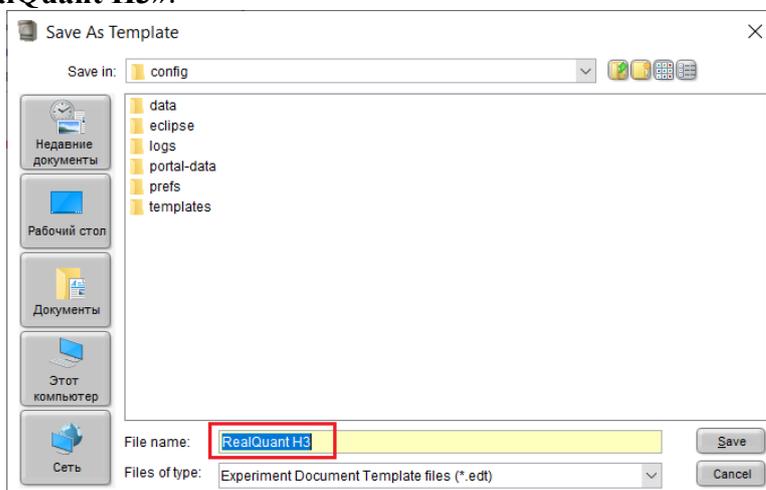
18. Установить следующие параметры ПЦР.



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».



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**»).

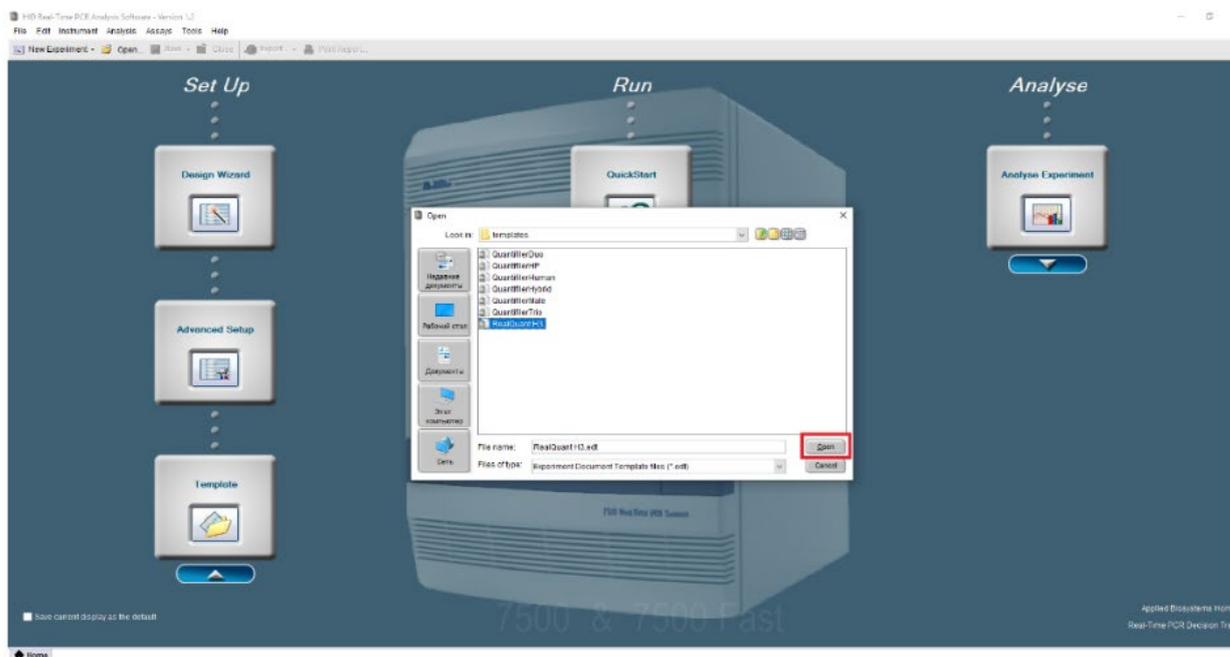


Последующие шаги идентичны как для программы **HID**, так и для программы **7500 Software**:

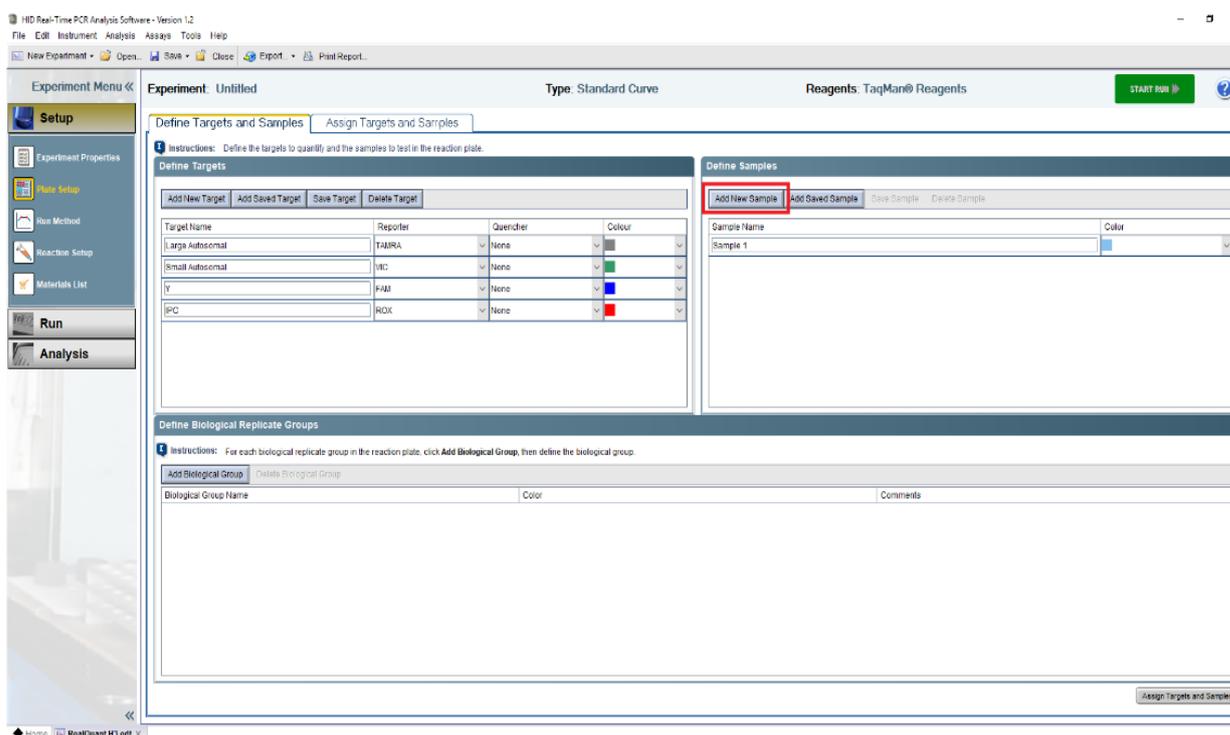
1. В открывшемся списке кликнуть по иконке «**Template**».



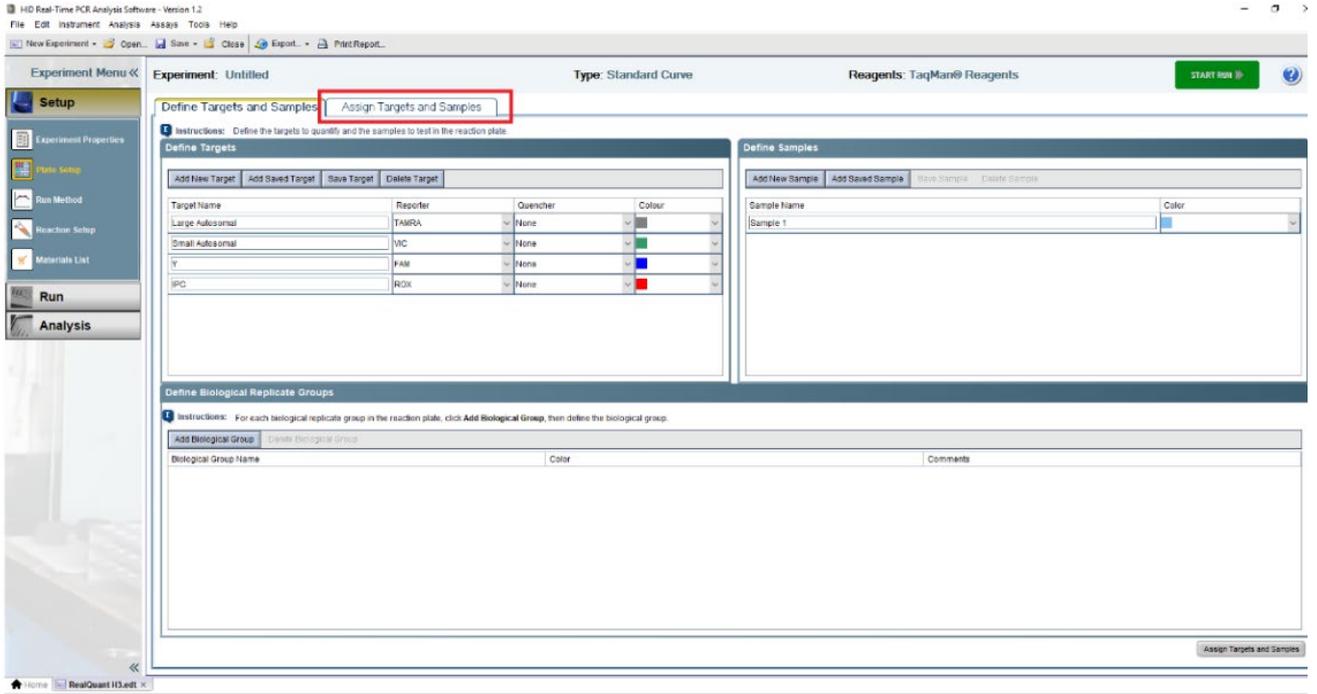
2. В открывшемся окне выбрать шаблон «RealQuant H3» и нажать «open».



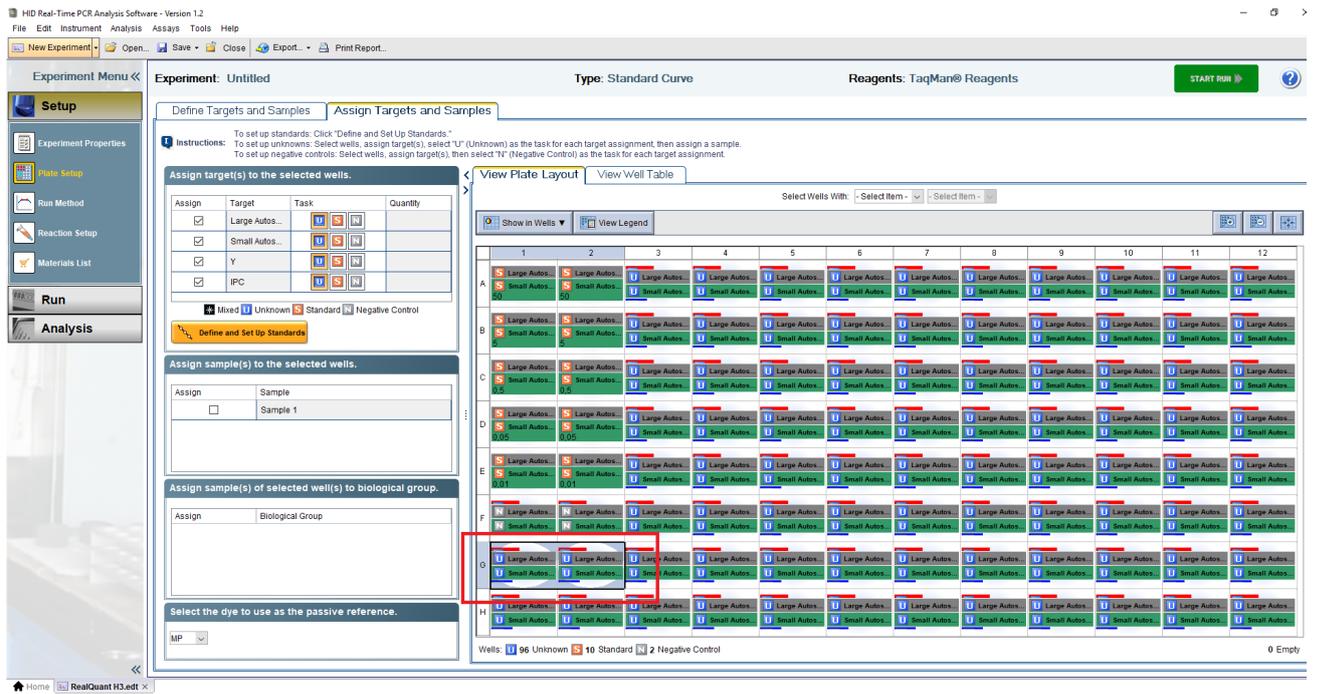
3. В открывшемся шаблоне необходимо добавить кол-во исследуемых образцов.



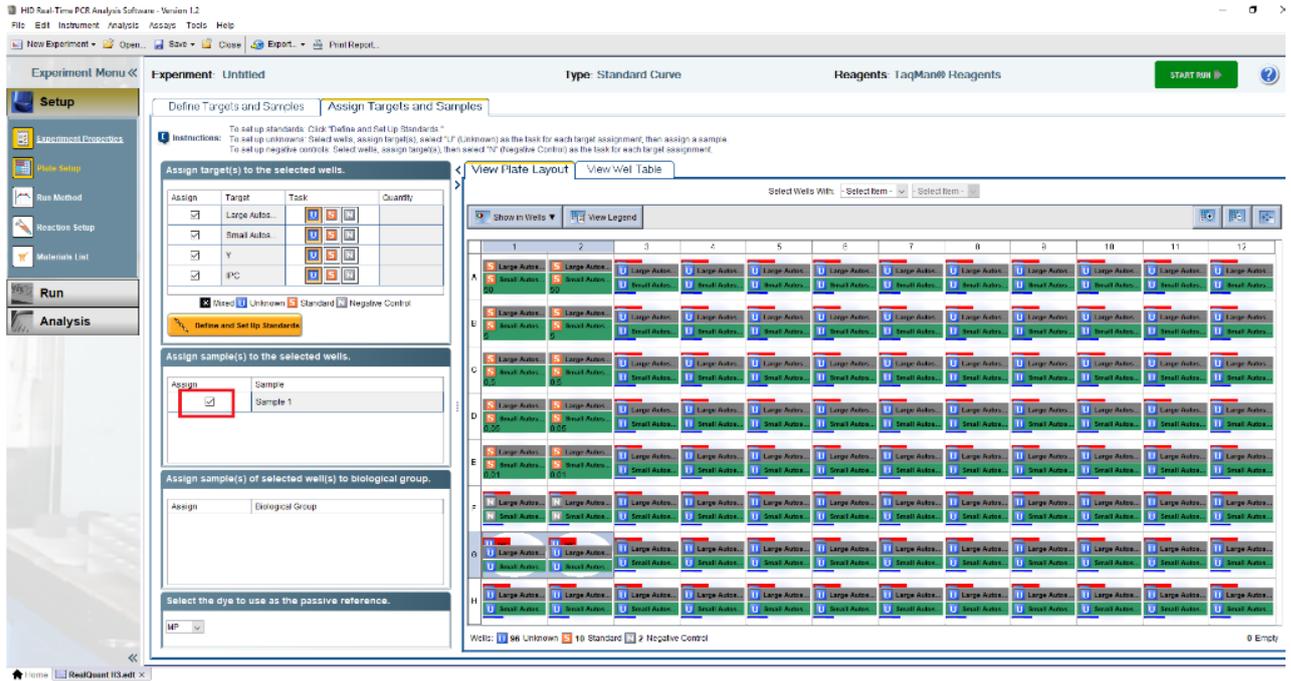
4. Перейти на вкладку «Assign Targets and Samples».



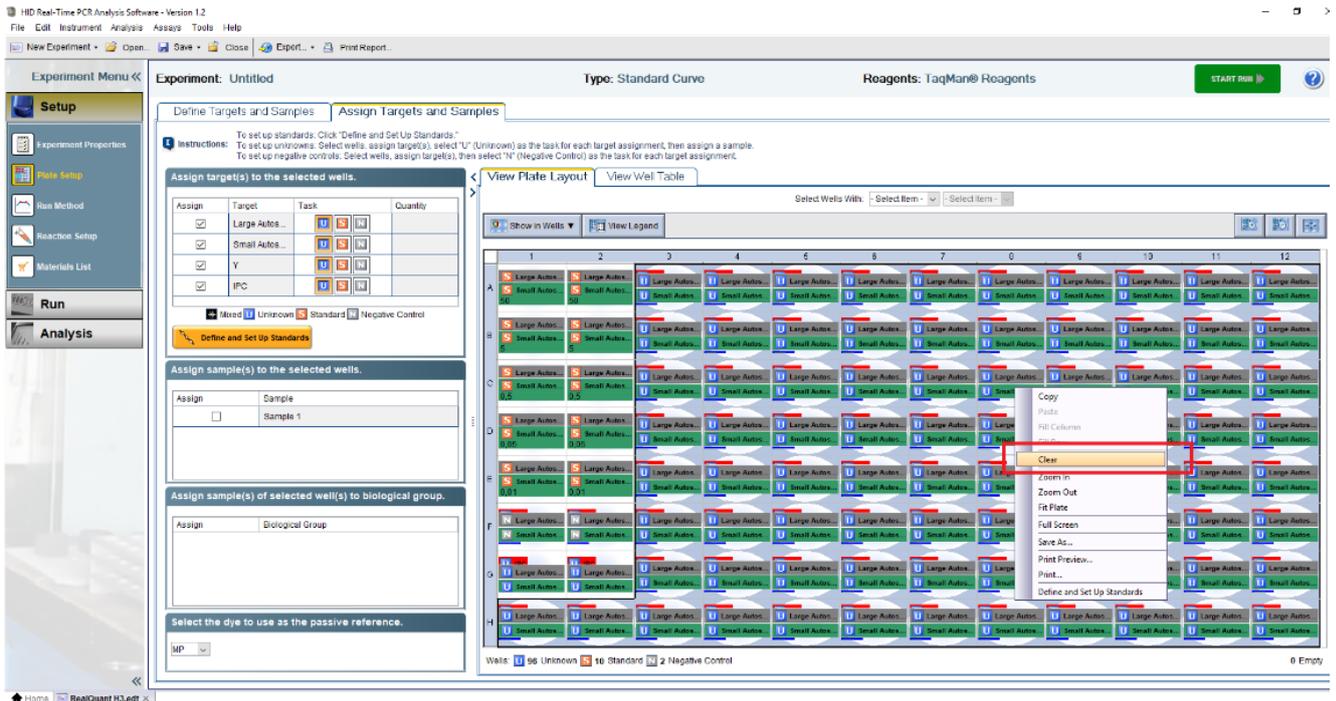
5. Отметить расположение исследуемых образцов на плашке.



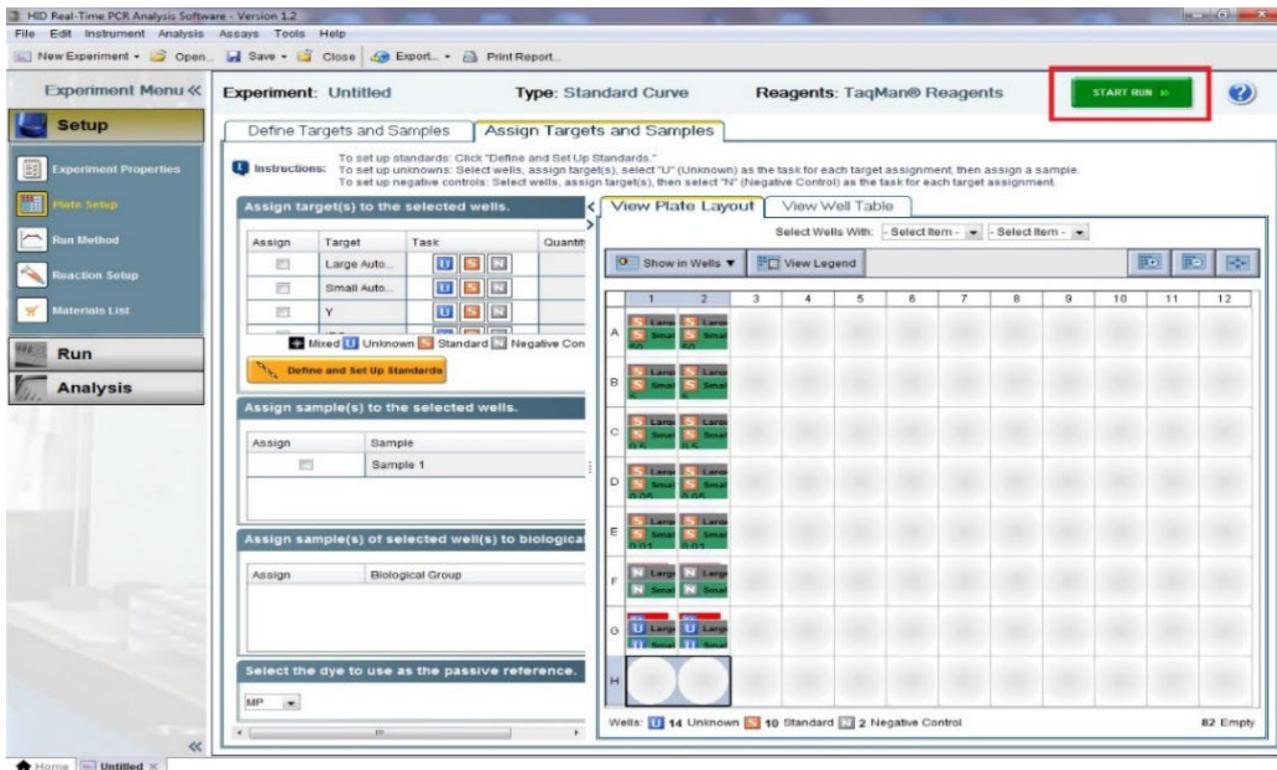
6. Применить название исследуемого образца.



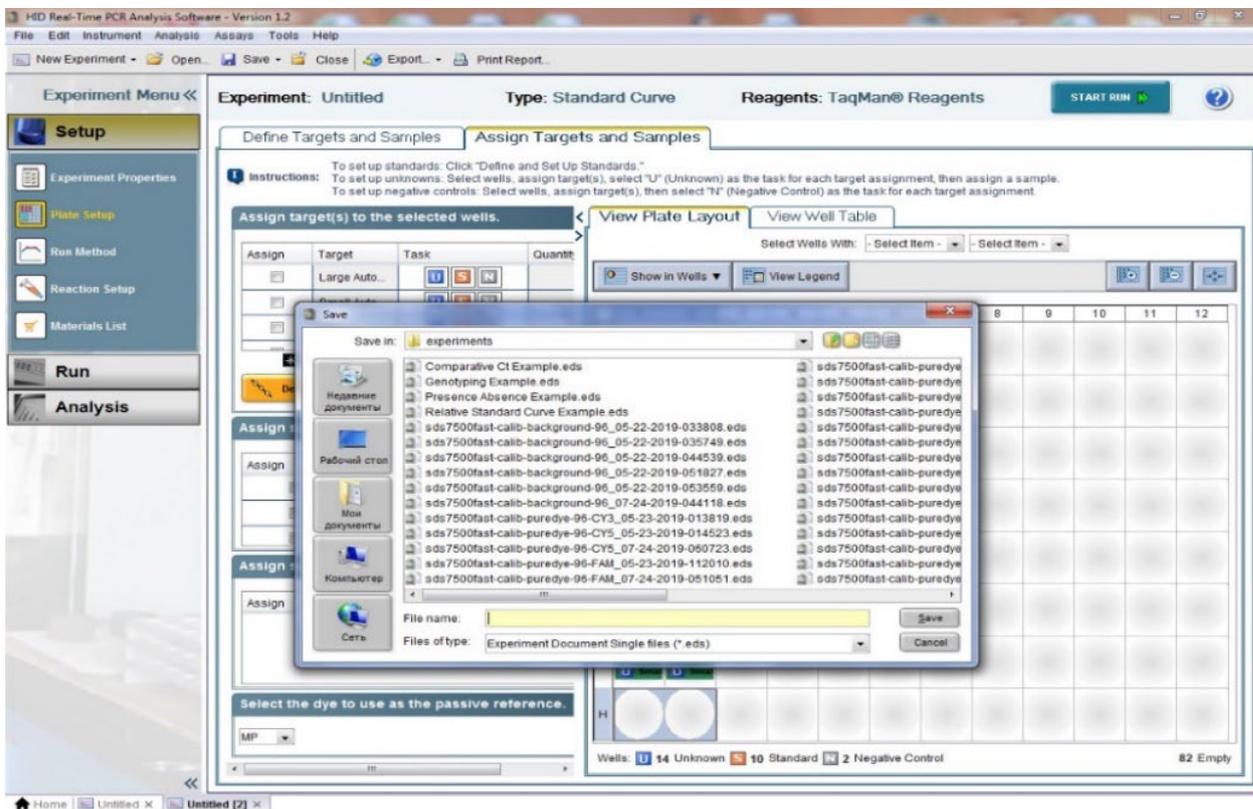
7. Очистить лунки без исследуемых образцов, выделив их и нажав правую кнопку мыши и выбрать «Clear».



8. Нажать клавишу «START RUN».



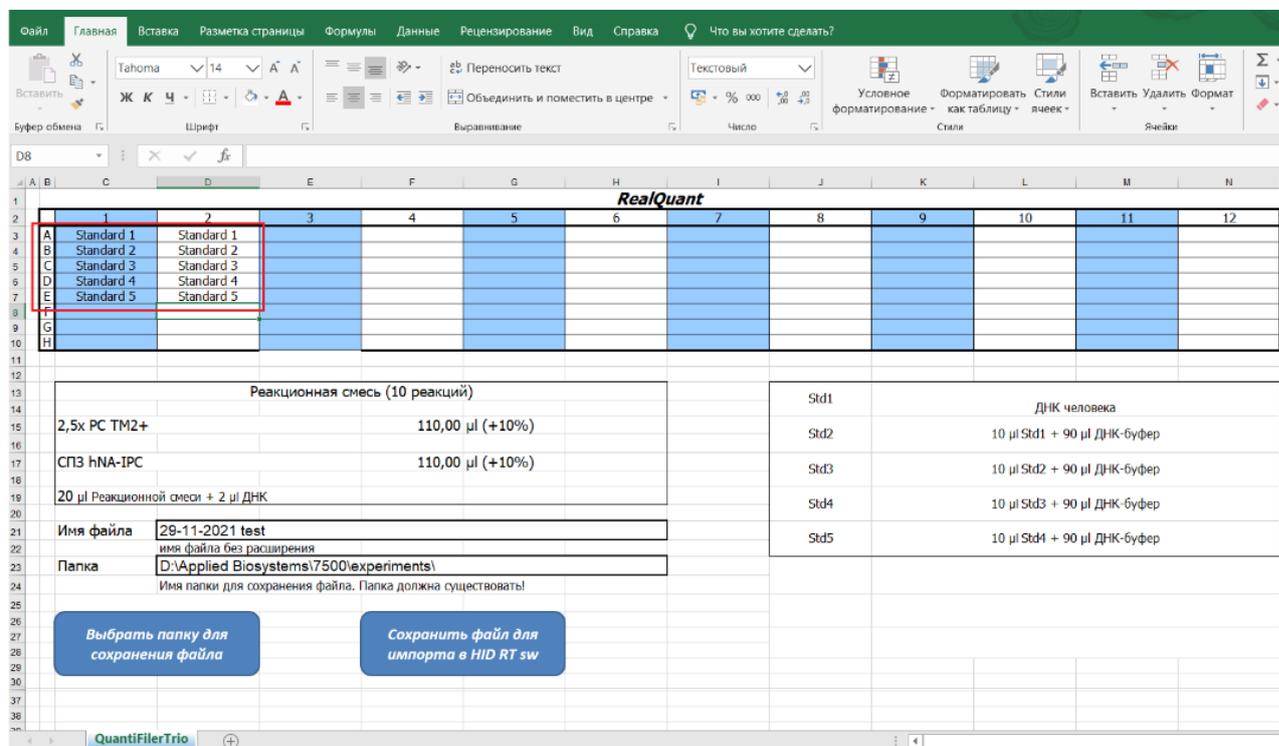
9. В появившемся окне выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «Save». Прибор начнет работу.



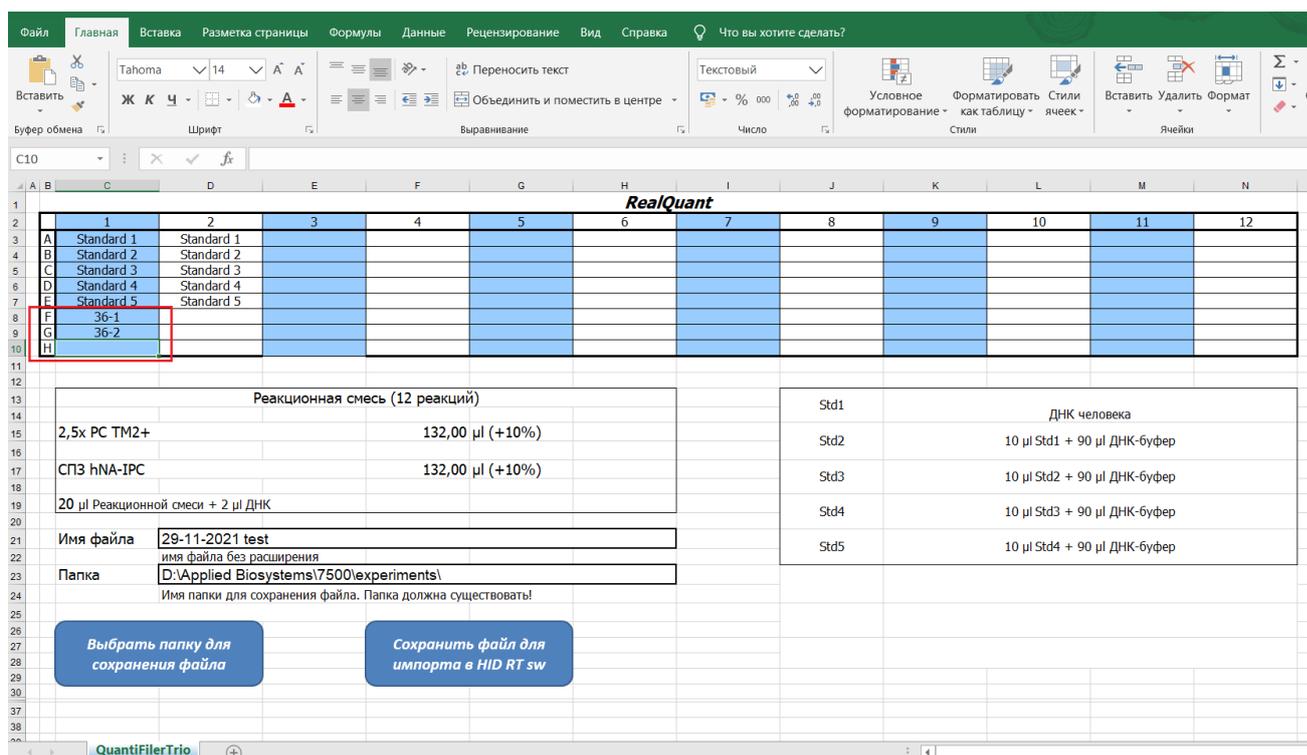
4.3. Заполнение названия образца в шаблоне Exel

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

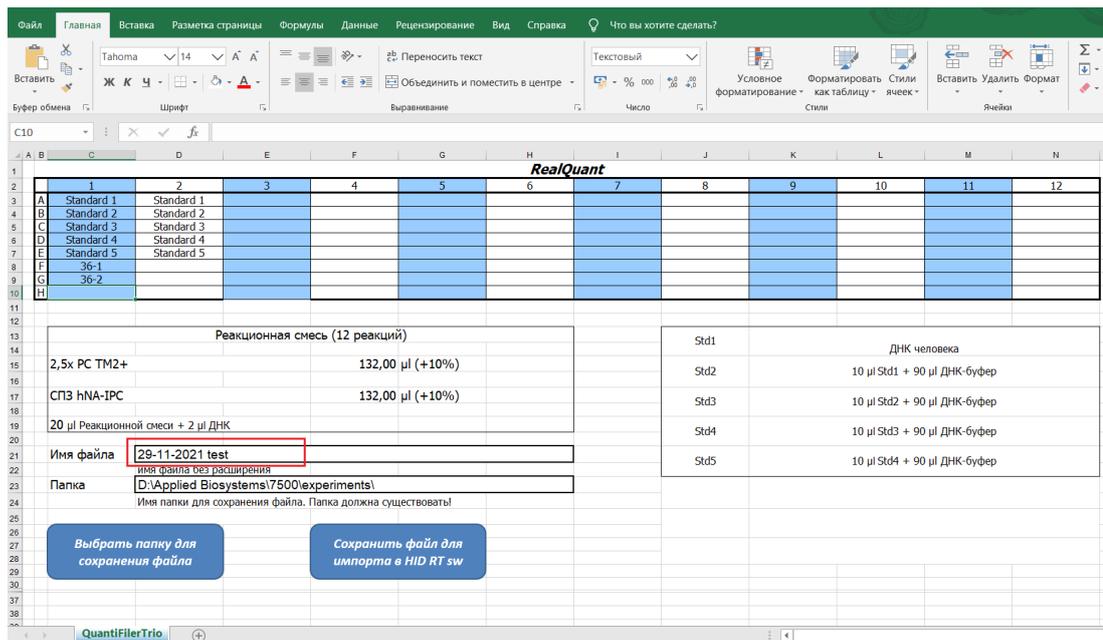
1. Открыть Exel шаблон «Заполнение плашки RQ».
2. Указать калибровочные образцы St в ячейках согласно их положению в лунках приготовленной плашки.



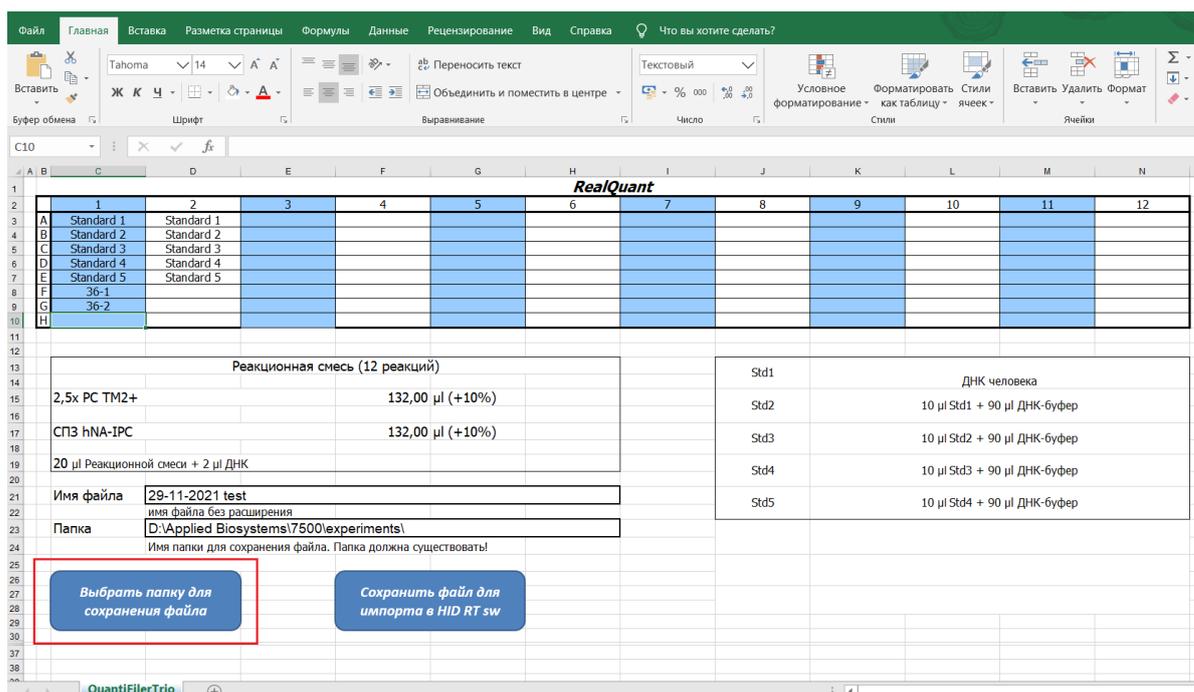
3. Согласно положению в лунках приготовленной плашки указать названия образцов.



4. Указать имя файла в соответствующей строке.



5. Выбрать папку для сохранения данных.



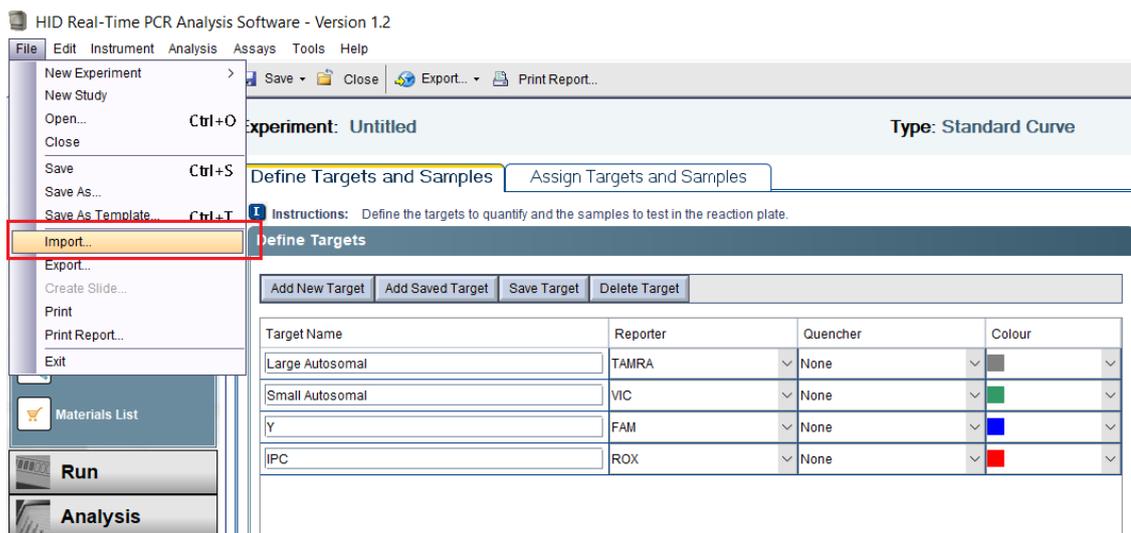
6. В открывшемся окне выбрать папку для сохранения (для легкого доступа к файлам рекомендуется выбрать папку Applied Biosystems\7500\experiments).

7. Нажать клавишу «Сохранить файл для импорта в HID RT sw».

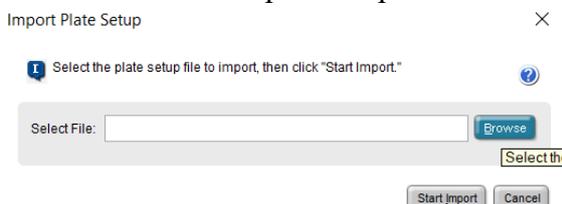
8. Закрывать шаблон Excel «Заполнение плашки RQ».

9. В программе HID либо открыть режим «Quantifiler Trio», либо открыть шаблон «Real Quant H3» следуя пункту 4.2.3 Запуск ПЦР-РВ с использованием шаблона RealQuant H3.

10. В верхнем меню выбрать «File» → «Import».



11. В открывшемся окне нажать «**Browse**» и выбрать сохранённый в шаблоне Excel файл данных.

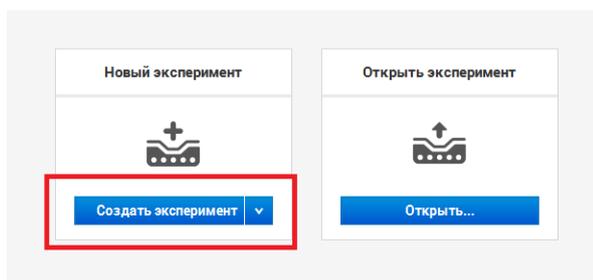


12. Нажать клавишу «**Start Import**». Файл данных загрузится в программу HID.
13. Убедиться в корректности расстановки образцов в плашке и их названии.
14. Нажать клавишу «**START RUN**».
15. В появившемся окне выбрать папку для сохранения файла, присвоить ему название, нажать «**Save**». Прибор начнет работу.
16. Для анализа данных перейдите к пункту 5 данной инструкции.

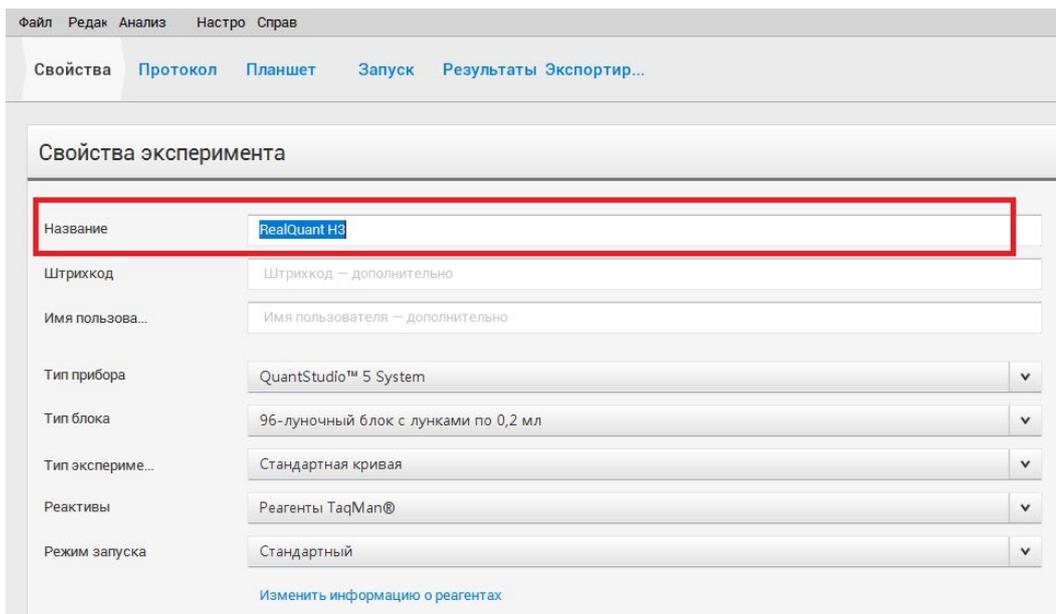
4.4. Программное обеспечение QuantStudio™ Design&Analysis

4.4.1. Создание шаблона эксперимента

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

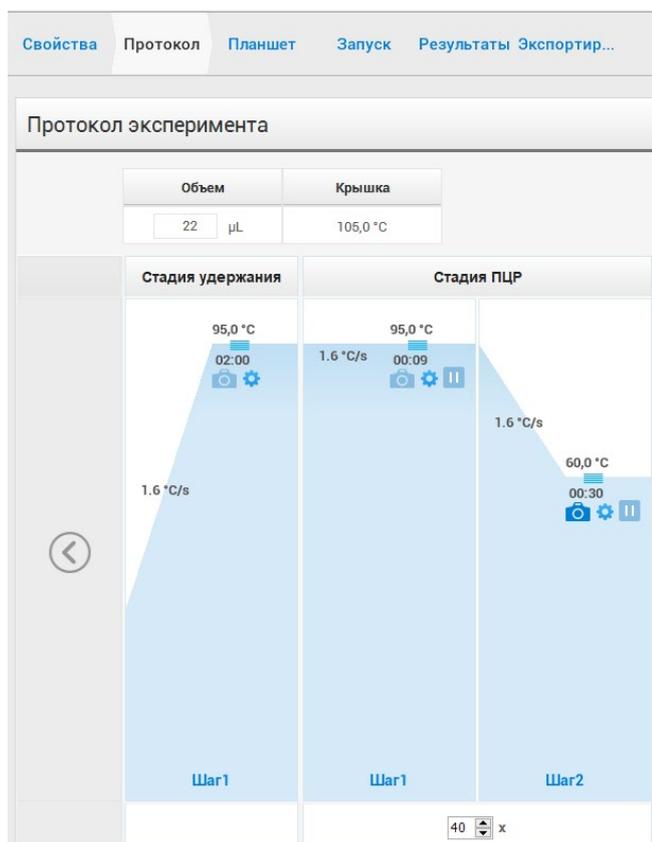


3. В открывшейся вкладке «Свойства» в графе «Название» написать имя шаблона – «RealQuant H3».



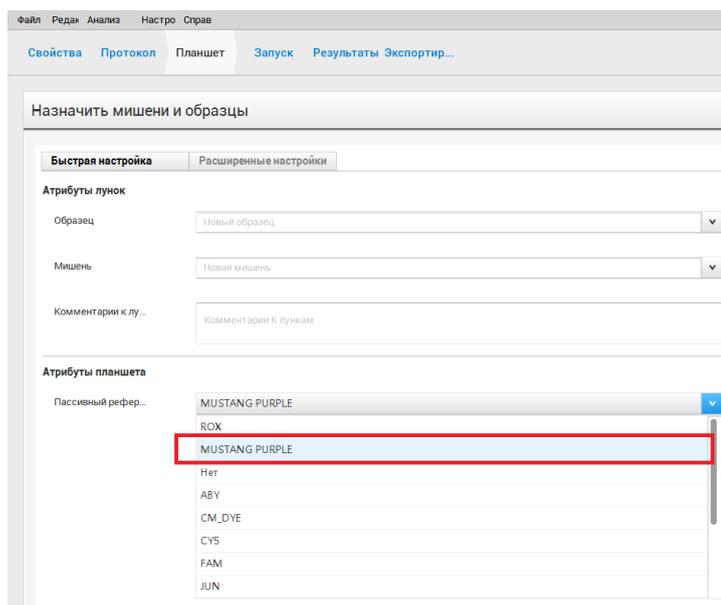
4. В правом нижнем углу нажать кнопку Далее

5. Во вкладке «**Протокол**» установить следующие параметры циклограммы:

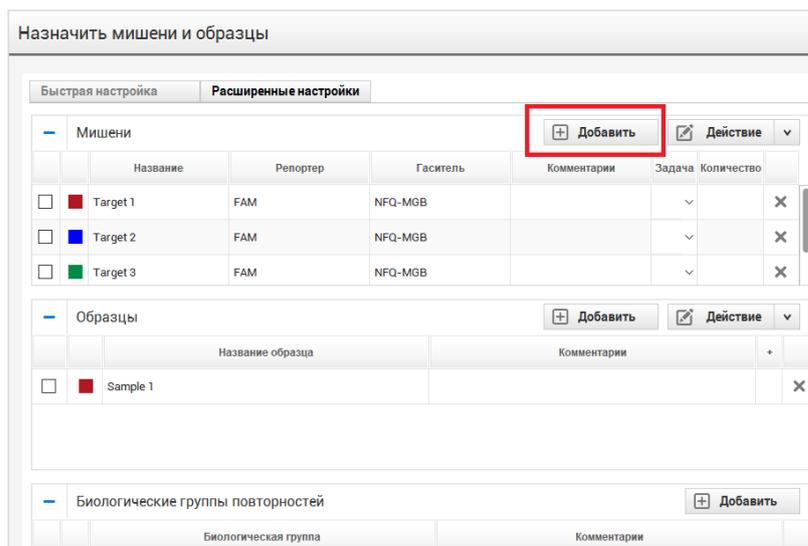


6. В правом нижнем углу нажать кнопку Далее

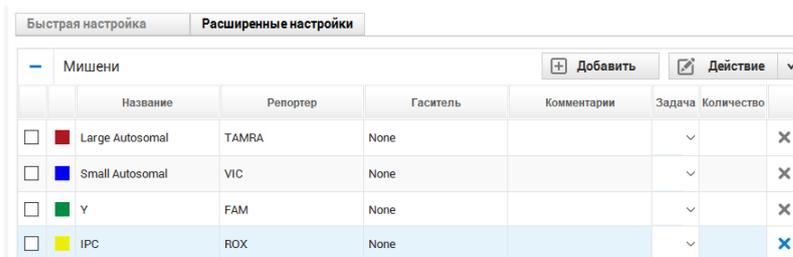
7. В открывшейся вкладке «Планшет» в пункте «Быстрая настройка» в графе «Пассивный референсный краситель» из выпадающего списка выбрать краситель «MUSTANG PURPLE».



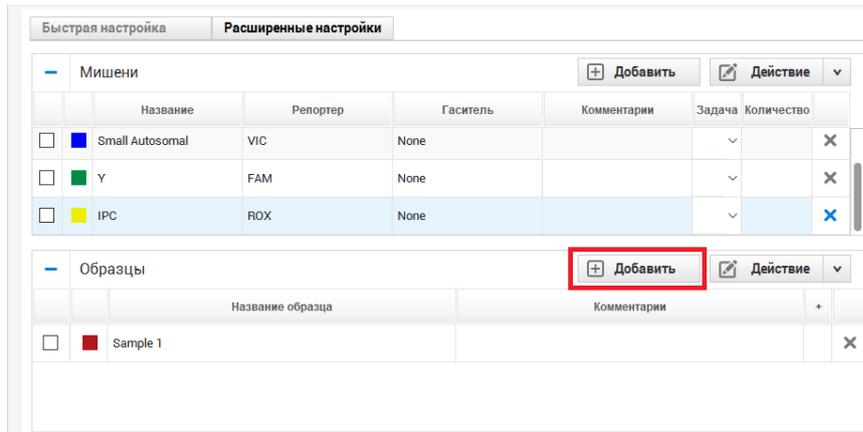
8. Перейти в пункт «Расширенные настройки». В разделе «Мишени» к существующей мишени (Target1) добавить еще три мишени, кликая по клавише «Добавить».



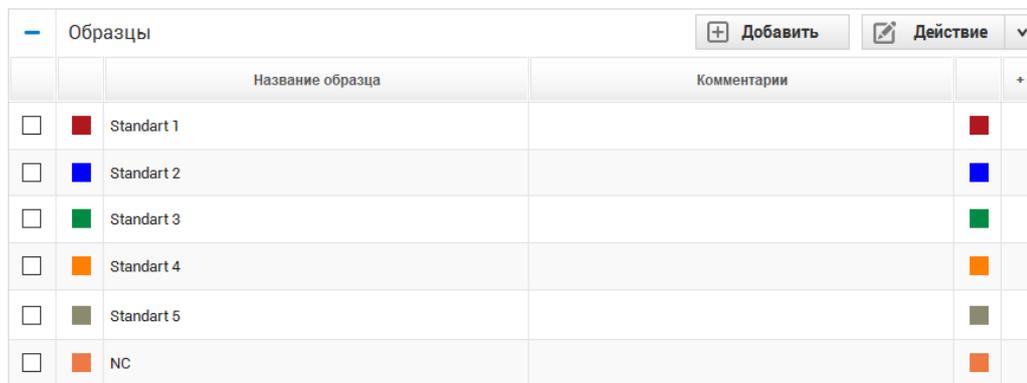
9. Обозначить мишени и выбрать для них соответствующие красители.



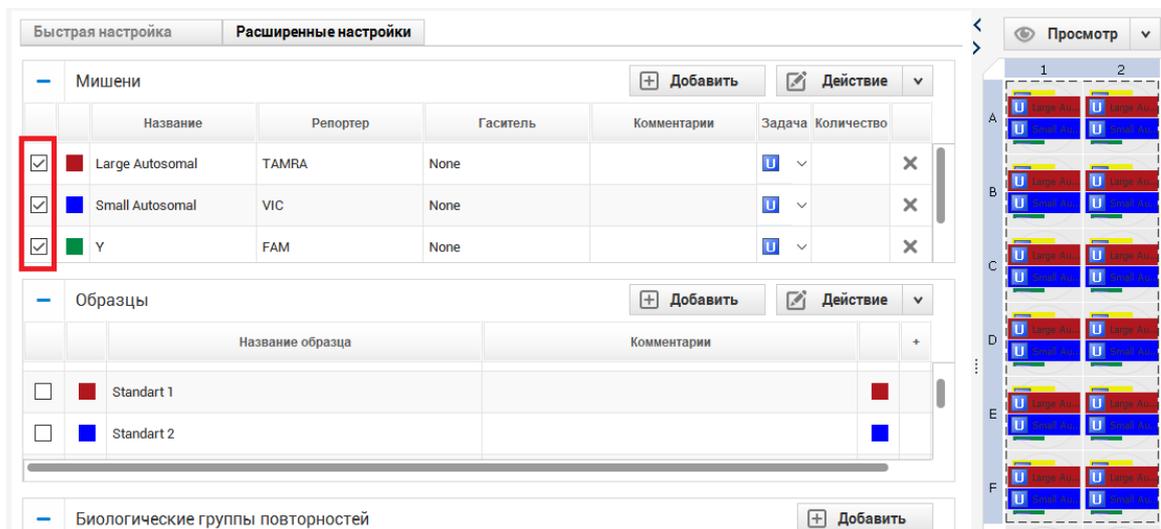
10. В разделе «Образцы» к Sample 1 добавить еще пять образцов, кликая по «Добавить».



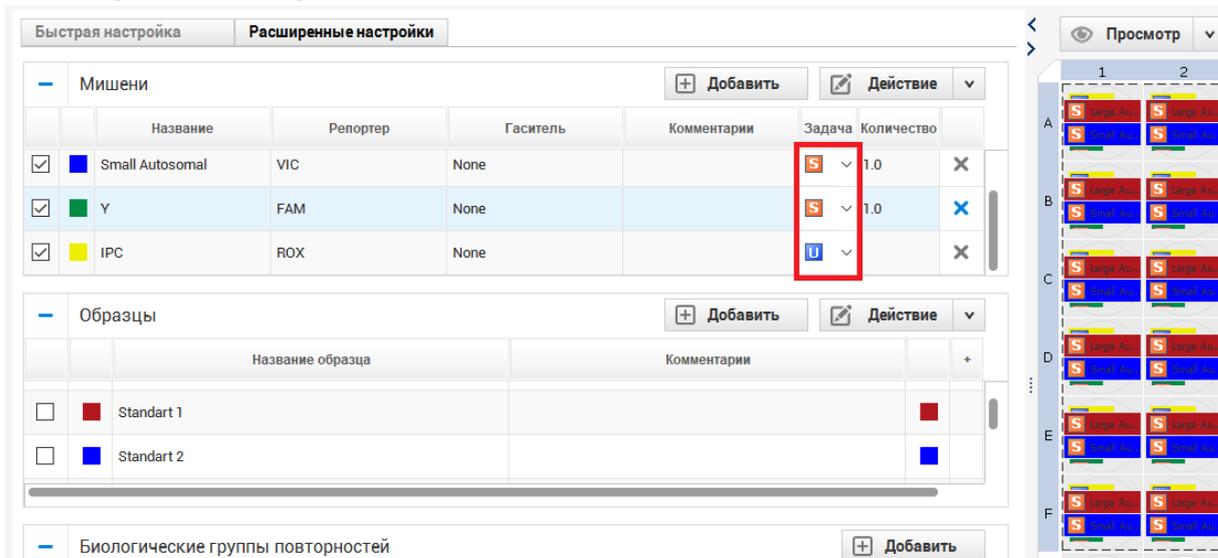
11. Переименовать образцы в Standart 1, 2, 3, 4, 5 и NC.



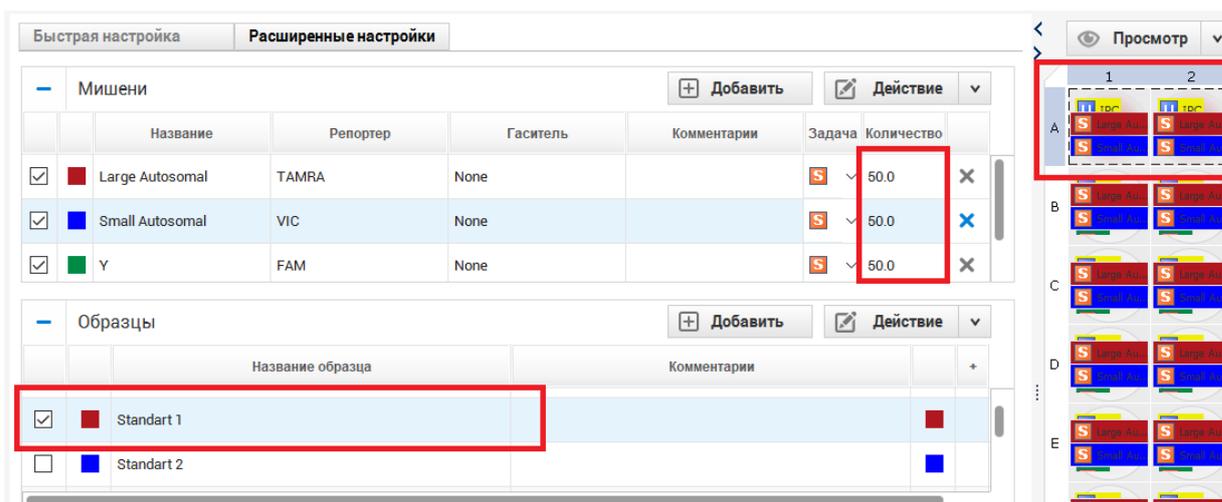
12. Расположить калибровочные образцы (стандарты) St в плашке и значить мишени.



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



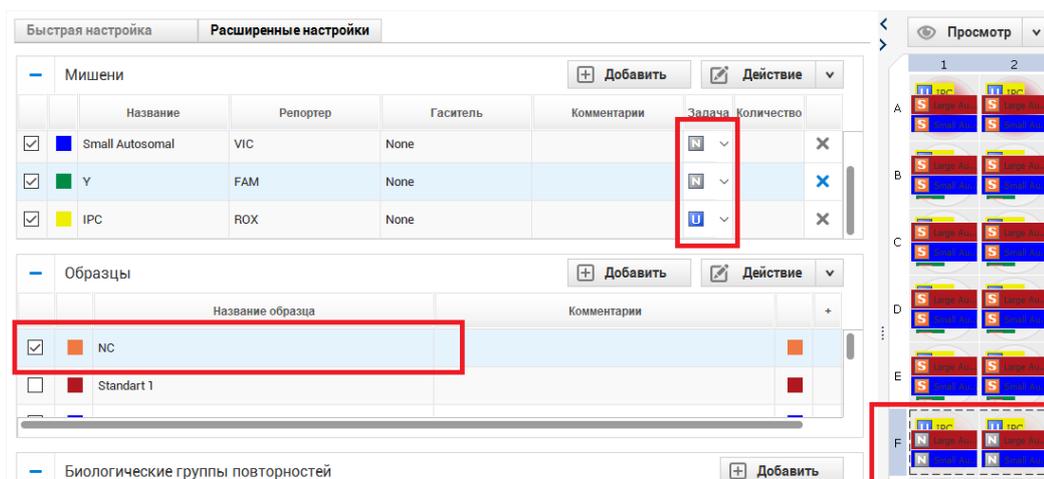
14. Выбрать повторы калибровочных образцов **St1**, задать концентрацию 50 и присвоить название Standard 1.



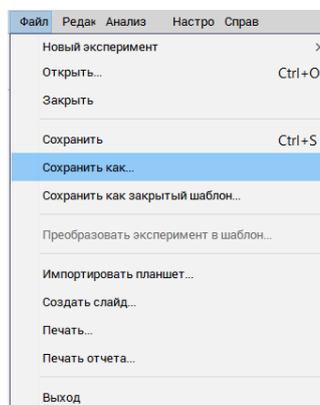
15. Задать концентрации для остальных калибровочных образцов **St2-St5** в следующем порядке: 5; 0,5; 0,05; 0,005. Присвоить названия калибровочным образцам **St2-St5**:

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

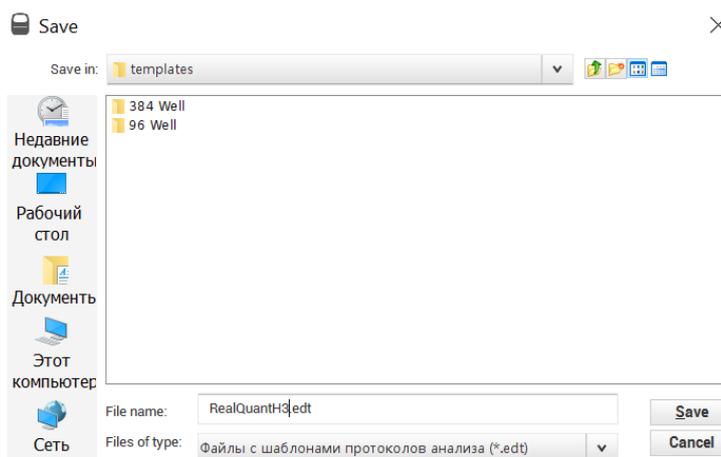
16. Под калибровочными образцами **St** отметить отрицательные контрольные образцы ПЦР – N. Присвоить им название NC.



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



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)



19. Нажать «Save» для сохранения шаблона.

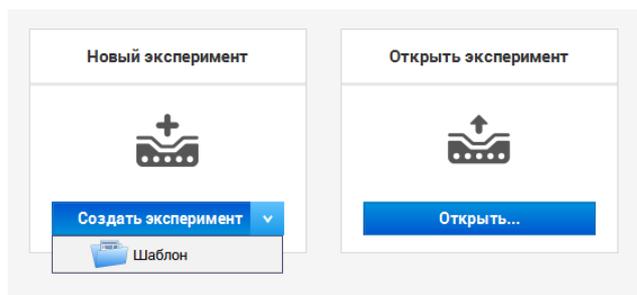
Созданный шаблон далее используется при проведении анализа с помощью набора «RealQuant H3».

4.4.2. Установка шаблона

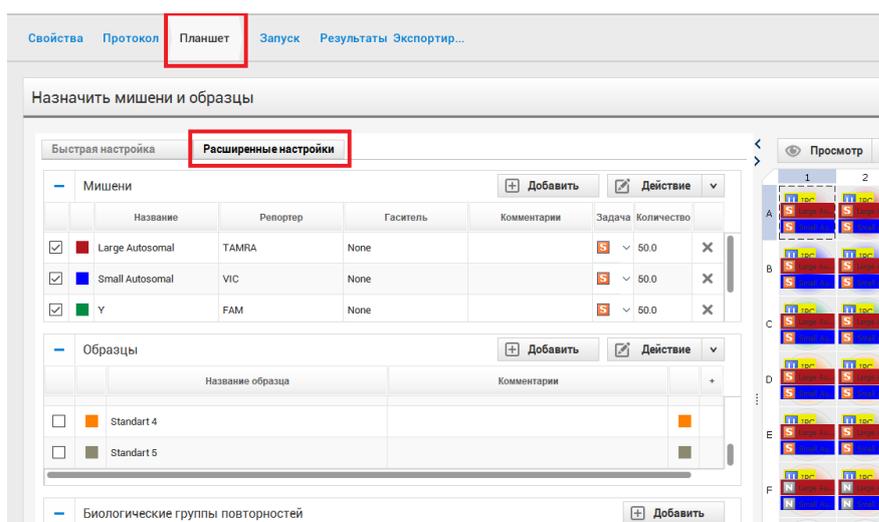
Актуальную версию готового Шаблона можно получить по запросу от производителя набора. Перед началом работы Шаблон необходимо скопировать в папку templates программы **QuantStudio Design & Analysis Software**, установленной на компьютере (например, локальный диск C/Applied Biosystems/templates).

4.4.3. Запуск ПЦР-ПВ с использованием шаблона RealQuant H3

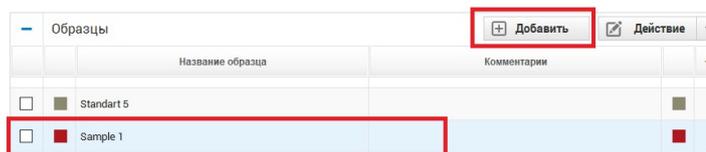
1. Открыть программу **QuantStudio Design & Analysis Software**.
2. В центре экрана, в разделе «Новый эксперимент» выбрать «Создать эксперимент» → «Шаблон».



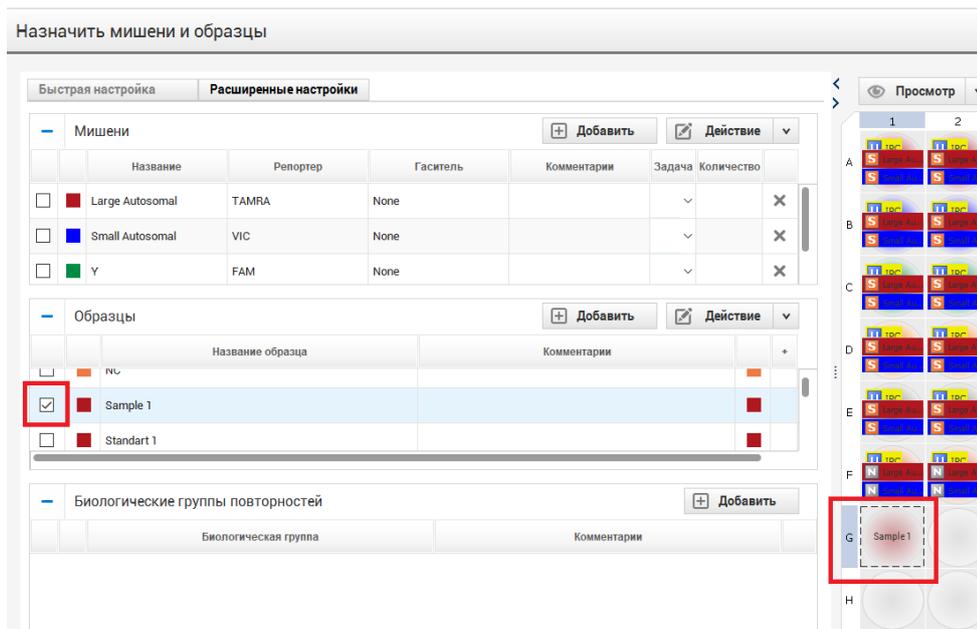
3. В открывшемся окне выбрать шаблон **RealQuant H3** и перейти на вкладку «Планшет» в пункт «Расширенные настройки».



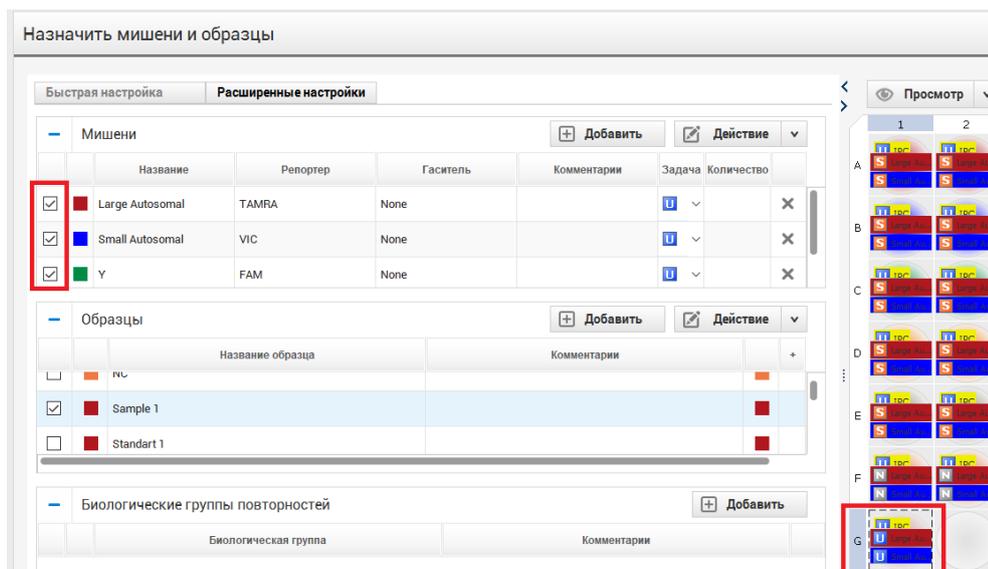
4. Добавить кол-во исследуемых образцов в разделе «Образцы».



5. Применить название исследуемого образца к конкретной лунке плашки.



6. Назначить мишени для исследуемого образца.



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.

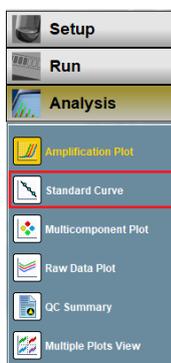
9. Для анализа данных перейдите к пункту 5 данной инструкции.

5. АНАЛИЗ ДАННЫХ

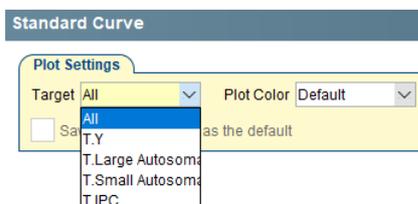
5.1. Программное обеспечение HID в режиме «Quantifiler Trio»

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 (R^2) > 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 **C_T 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:

$$\frac{\text{Концентрация мишени Small autosomal (нг/мкл)}}{\text{Концентрация мишени Large autosomal (нг/мкл)}}$$

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 смешанных образцах осуществляется по формуле:

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

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 ≤ C_{T NC}+2**. Получение значений, превышающих значение **C_T** для **T.IPC** отрицательного контроля (**NC**) более чем на 2 цикла (**C_T > C_{T 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

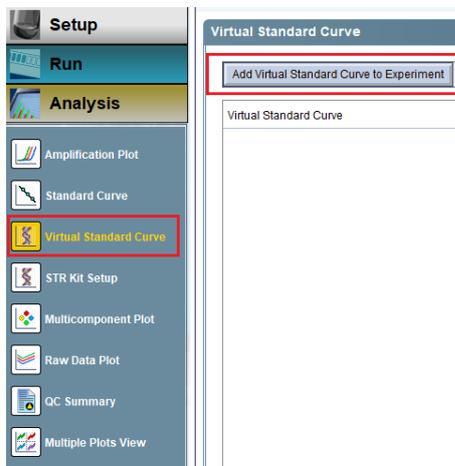
В программном обеспечении **НID** версии 1.3 при работе в вкладке «**Quantifiler Trio**» предусмотрена возможность сохранения параметров калибровочной кривой (создание так называемой «Виртуальной калибровочной кривой») с возможностью их применения к образцам из других постановок ПЦР в реальном времени.

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.

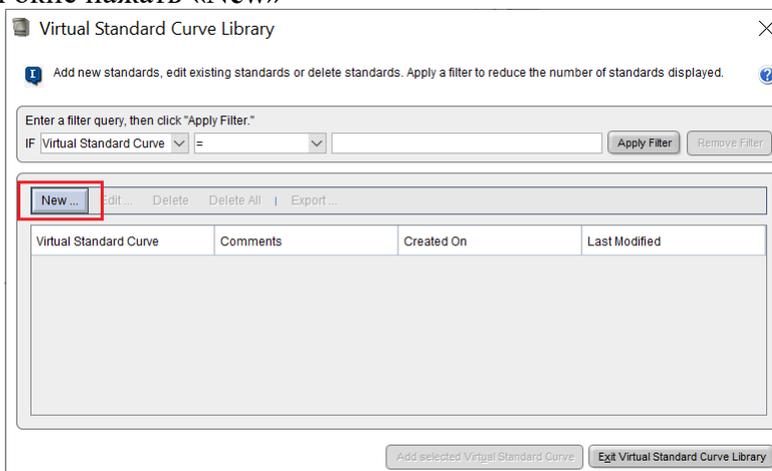
5.1.2.1. Создание виртуальной калибровочной кривой

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

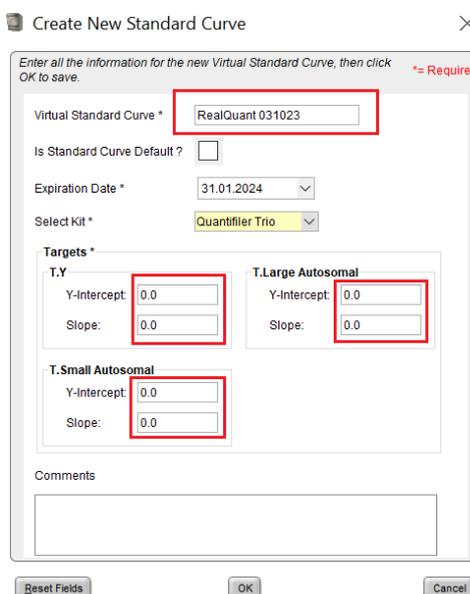
- наклон калибровочной прямой – от -3,3 до -3,6.
- 2. Записать значения Y-Intercept и Slope для калибровочной кривой каждой мишени.
- 3. Перейти в раздел «Virtual Standard Curve» и кликнуть по клавише «Add Virtual Curve to Experiment»



- 4. В открывшемся окне нажать «New»



- 5. Затем в графе «Virtual Standard Curve» 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

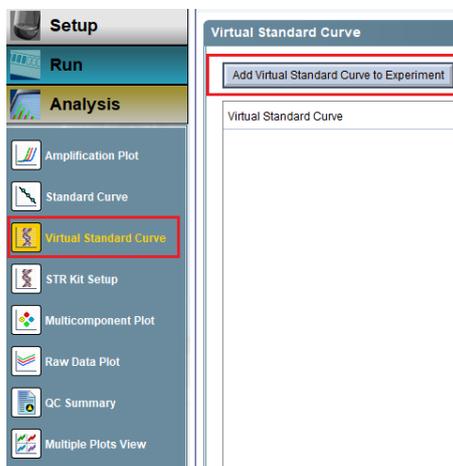


6. Нажать «ОК» для сохранения калибровочной кривой.

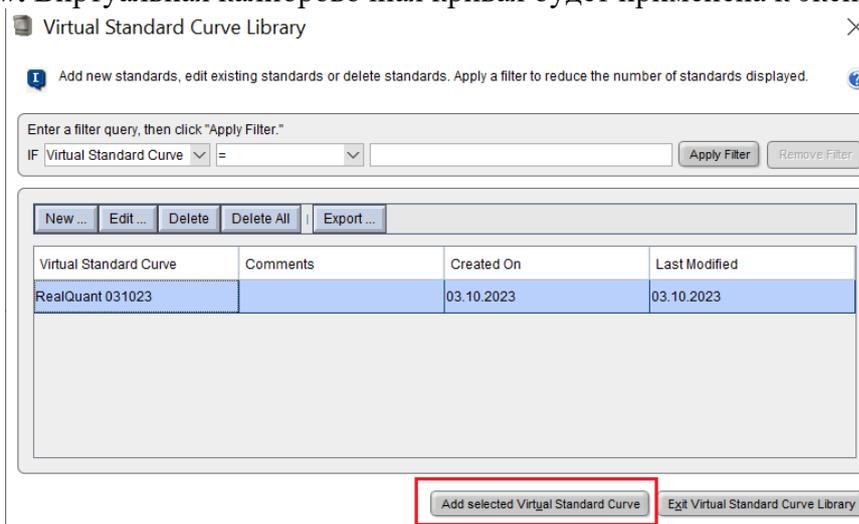
5.1.2.2. Применение виртуальной калибровочной кривой

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.



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.).

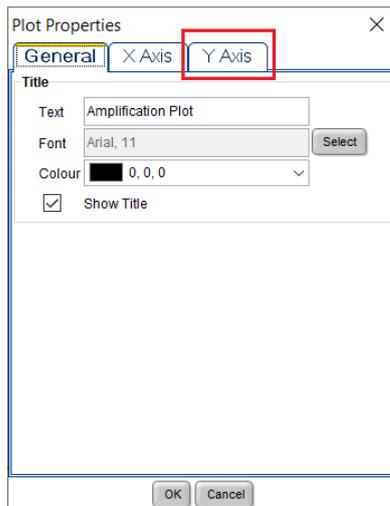
При анализе данных в программе **HID** или **7500 Software**, полученных с использованием набора «RealQuant» впервые, возможно несоответствие шкалы уровня флуоресценции (ΔR_n) на

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

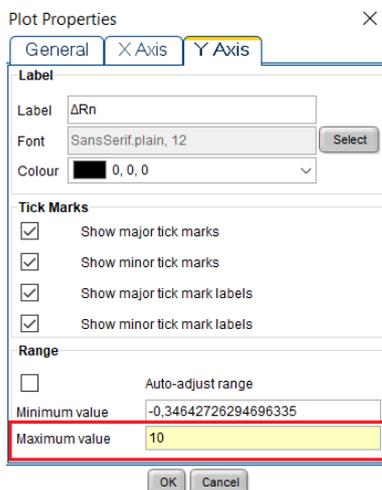
7. Кликнуть по иконке «Plot properties».



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



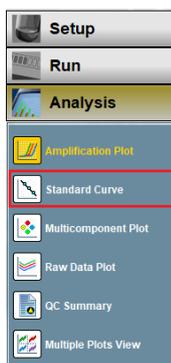
9. В графе **Maximum value** установить значение **10** и нажать **ОК**.



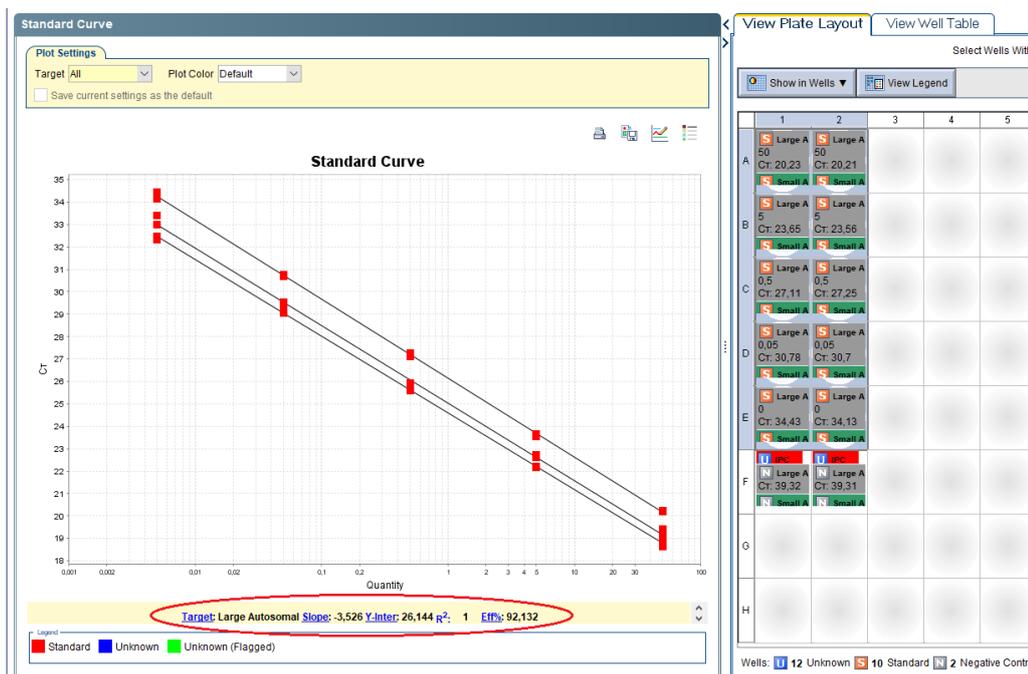
Амплификационные кривые станут видны на амплификационном графике.

Оценить **калибровочные образцы (St)** и калибровочную прямую:

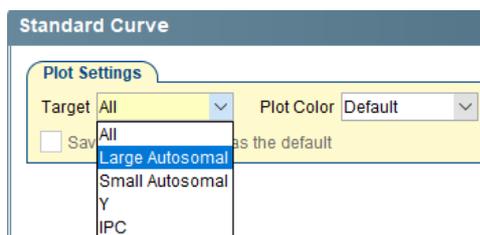
10. Кликнуть по иконке «Standard Curve» во вкладке **Analysis**.



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



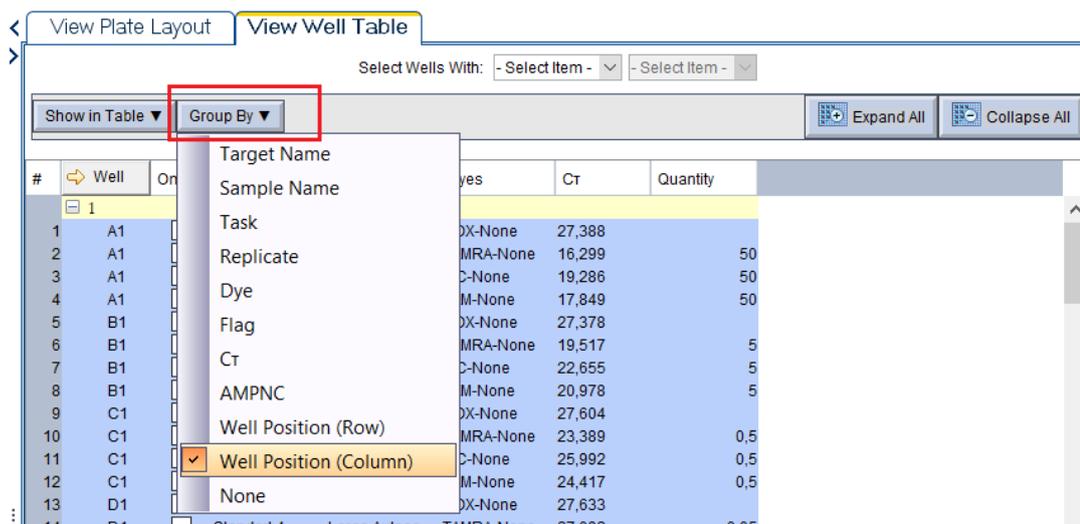
12. В графе **Target** последовательно открыть калибровочную прямую для каждой мишени.



13. Убедиться, что параметры каждой калибровочной прямой соответствуют значениям:
 - коэффициент корреляции (R^2) > 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.



15. Оценить значения в столбце **Quantity** и **С_T** 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:

$$\frac{\text{Концентрация мишени Small autosomal (нг/мкл)}}{\text{Концентрация мишени Large autosomal (нг/мкл)}}$$

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 **С_T** мишени **Y** в таблице «**View Well Table**». Наличие значений **С_T ≤ 35,0** говорит о присутствии мужской ДНК в образце, отсутствие сигнала или **С_T > 35,0** о женской ДНК.

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

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

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 **С_T** внутреннего положительного контроля – **IPC**. Значения **С_T** для **IPC** исследуемых образцов не должны превышать значения **С_T** для **IPC** отрицательного контроля (**NC**) более чем на 2 цикла: **С_T ≤ С_T NC+2**. Получение значений, превышающих значение **С_T** для **IPC** отрицательного контроля (**NC**) более чем на 2 цикла (**С_T > С_T NC+2**) будет свидетельствовать о наличии ингибиторов в образце ДНК.

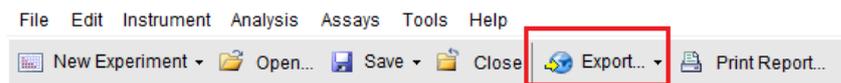
Если по основным мишеням (**Small autosomal**, **Large autosomal** и **Y**) сигнал не детектируется, а по **IPC** сигнал есть, но его значение **С_T > С_T NC+2**, или если сигнал не детектируется ни по основным мишеням (**Small autosomal**, **Large autosomal** и **Y**), ни по **IPC**,

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

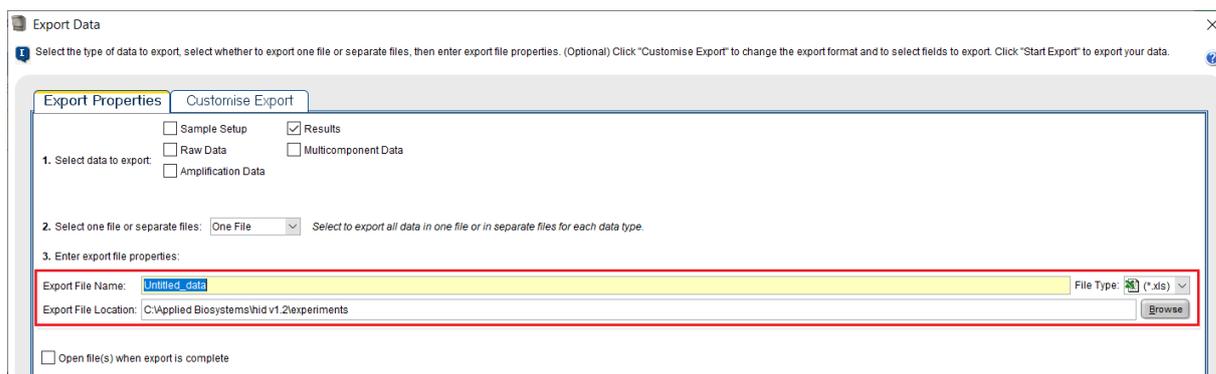
5.2.2. Автоматическая оценка результатов

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

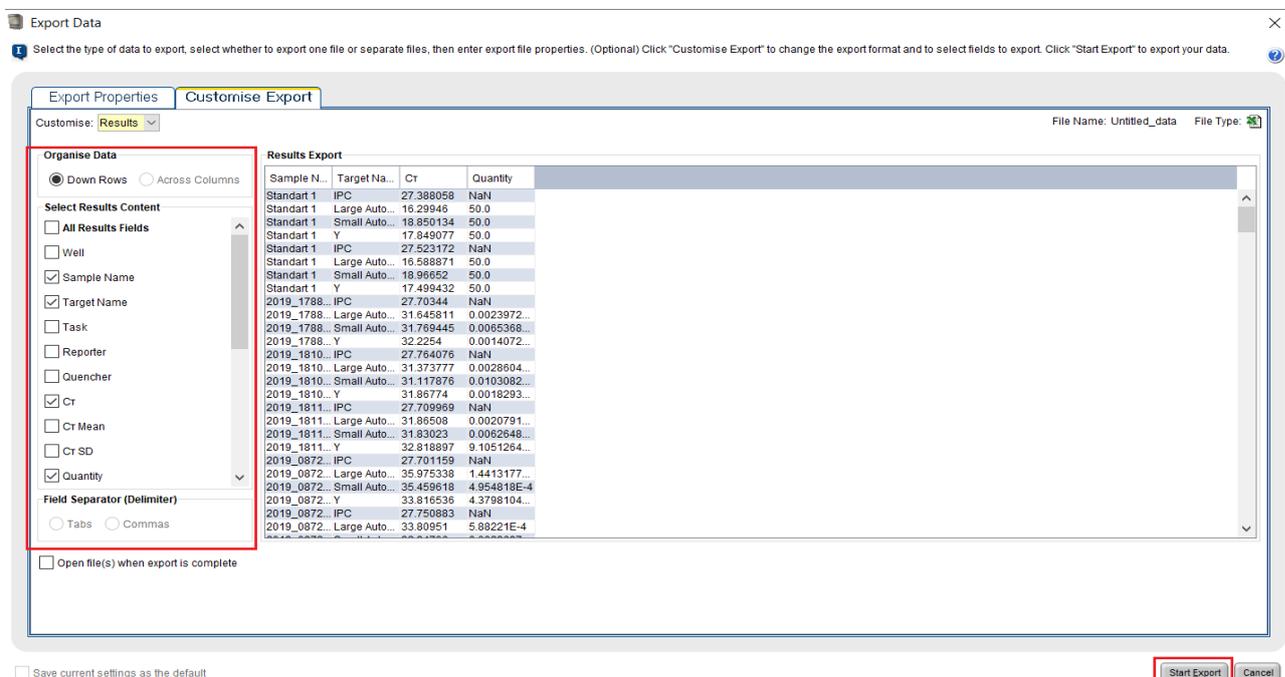
1. Нажать «Export».



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



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

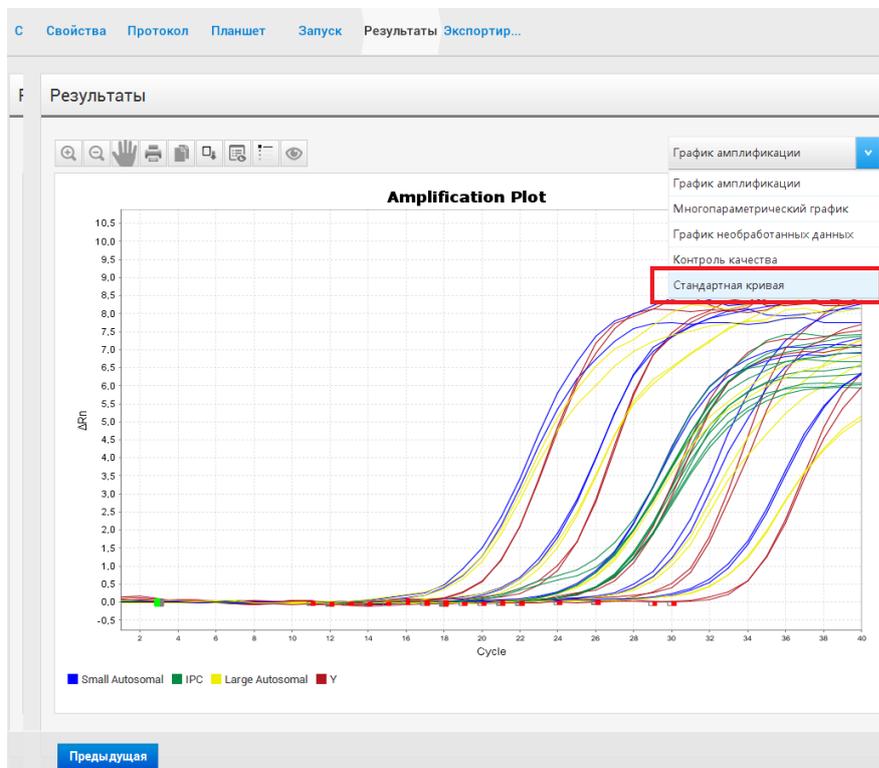


4. Открыть полученный файл Excel, выделить и копировать результаты. Открыть шаблон для расчета степени деградации и разведения образцов (предоставляет производитель набора). На листе «Данные rQ» выделить ячейку A1 (отмечена желтым), нажать правую кнопку мыши и выбрать пункт Вставить Данные загрузятся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

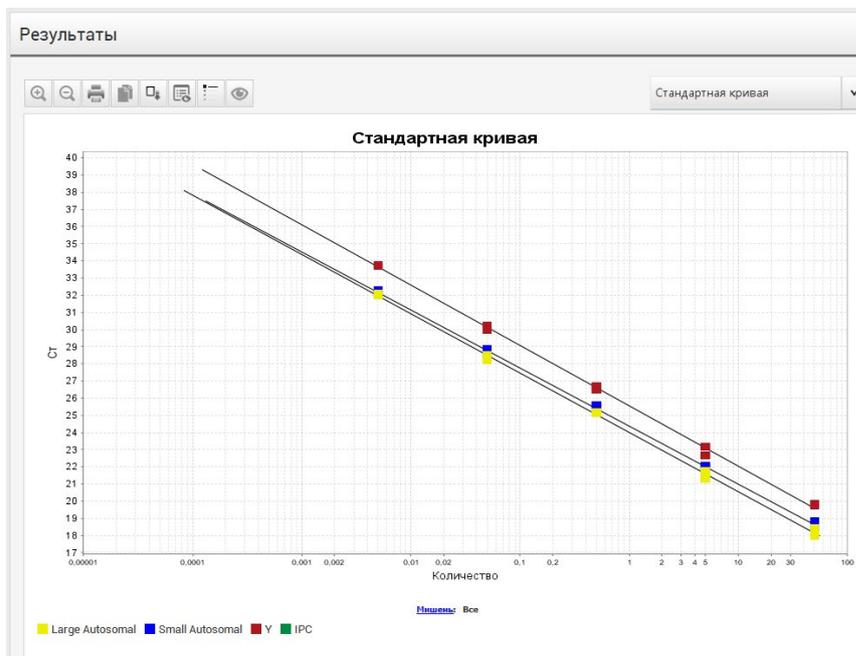
5.3. Программное обеспечение QuantStudio Design& Analysis Software

5.3.1. Обработка результатов

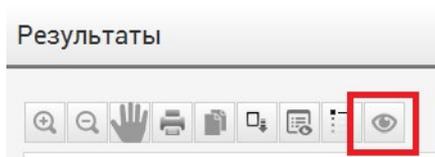
1. Открыть полученный в ходе амплификации файл данных, используя программное обеспечение **QuantStudio Design& Analysis Software**.
2. Оценить **калибровочные образцы (St)** и калибровочную прямую.



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



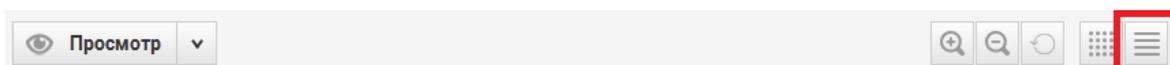
4. Нажать на клавишу **«Параметры графика»**, последовательно открыть калибровочную прямую для каждой мишени.



- Убедиться, что параметры каждой калибровочной прямой соответствуют значениям:
 - коэффициент корреляции (R^2) > 0.99;
 - наклон калибровочной прямой – от -3,3 до -3,6.

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

- В меню планшета справа выбрать данные списком.



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

#	Лунка	Название ...	Ст	Количество		
1	A1	Y	67	50,000		
1	A1	IF	00			
1	A1	L	88	50,000		
1	A1	S	00	50,000		
2	A2	Y	8	0,005		
2	A2	IF	01			
2	A2	L	00	0,005		
2	A2	L	00	0,005		
2	A2	Small Aut...	STANDA...	VIC-None	32,069	0,005
3	A3	Y	UNKNOW	FAM-None	19,755	45,311
3	A3	IPC	UNKNOW	ROX-None	23,897	
3	A3	Large Aut...	UNKNOW	TAMRA...	18,058	52,944
3	A3	Small Aut...	UNKNOW	VIC-None	18,861	43,020
4	A4	Y	UNKNOW	FAM-None	34,558	0,003
4	A4	IPC	UNKNOW	ROX-None	25,925	
4	A4	Large Aut...	UNKNOW	TAMRA...	33,078	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:

$$\frac{\text{Концентрация мишени Small autosomal (нг/мкл)}}{\text{Концентрация мишени Large autosomal (нг/мкл)}}$$

Использовать 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 $C_T \leq 35,0$ говорит о присутствии мужской ДНК в образце, отсутствие сигнала или $C_T > 35,0$ о женской ДНК.

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

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

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».

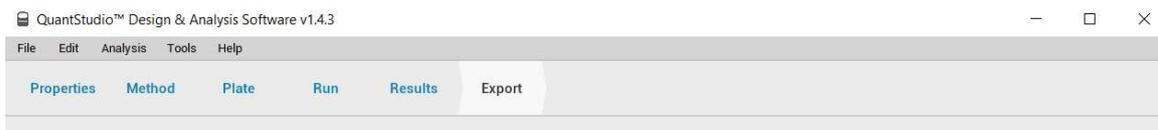
Оценка ингибирования установить значения C_T внутреннего положительного контроля – **IPC**. Значения C_T для **IPC** исследуемых образцов не должны превышать значения C_T для **IPC** отрицательного контроля (**NC**) более чем на 2 цикла: $C_T \leq C_{T \text{ NC}} + 2$. Получение значений, превышающих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

Sample No.	Target Na...	CT	Quantity
Standard 1	IPC	27.712	
Standard 1	Large Aut...	18.421	50.000
Standard 1	Small Aut...	18.729	50.000
Standard 1	Y	19.155	50.000
Standard 1	IPC	28.064	
Standard 1	Large Aut...	18.755	50.000
Standard 1	Small Aut...	18.543	50.000
Standard 1	Y	19.594	50.000
Standard 2	IPC	28.118	
Standard 2	Large Aut...	22.027	5.000

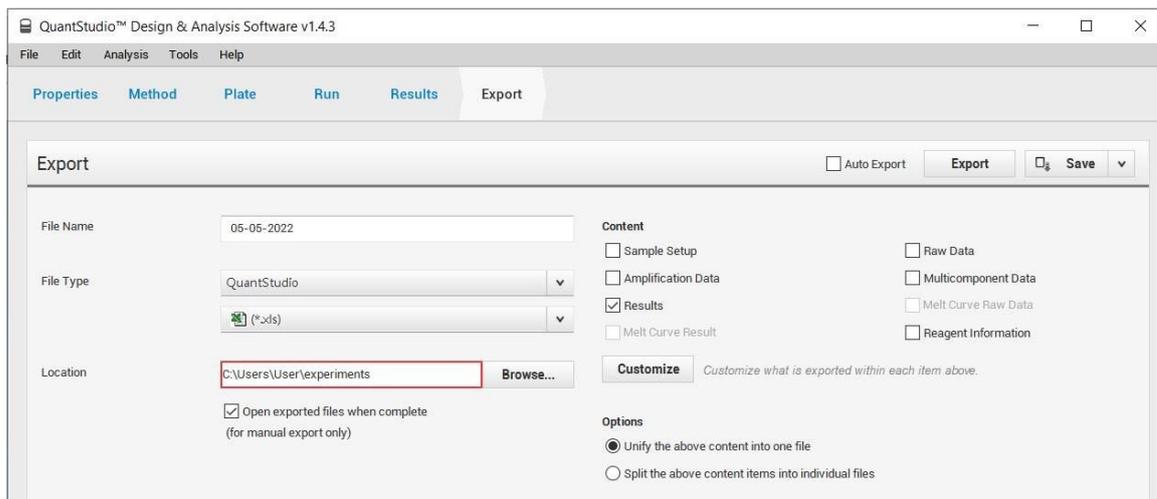
Если по основным мишеням (**Small autosomal**, **Large autosomal** и **Y**) сигнал не детектируется, а по **IPC** сигнал есть, но его значение $C_T > C_{T \text{ NC}} + 2$, или если сигнал не детектируется ни по основным мишеням (**Small autosomal**, **Large autosomal** и **Y**), ни по **IPC**, необходимо 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».



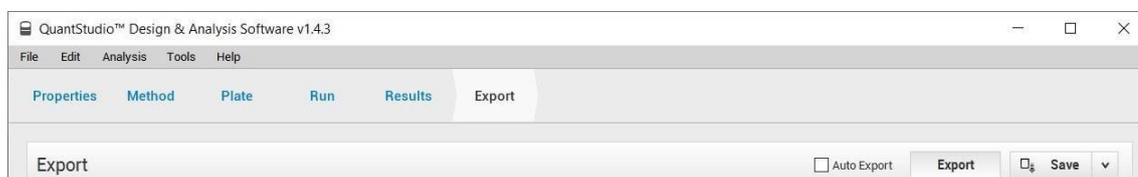
2. В открывшемся окне присвоить файлу данных название и выбрать папку для экспорта. В разделе «Content» оставить галочку только в графе **Results**. Нажать «Customize».



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

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, **Ct** – в третьем, а **Quantity** в четвёртом.

5. В исходном окне нажать «Export».



6. 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».

6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице:

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

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

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, syntol@syntol.ru