

Июль 2021 г.

Руководство по использованию набора реагентов Investigator[®] 26plex QS

Мультиплексная амплификация
основных локусов системы CODIS;
европейского стандартного набора
локусов, а также локусов plus Penta D,
Penta E, D6S1043, DYS391 и
амелогенина

Содержание

Содержимое набора.....	3
Хранение.....	4
Предполагаемое использование	4
Инструкции по технике безопасности	5
Контроль качества	5
Введение.....	6
Оборудование и реактивы, поставляемые пользователю	8
Протокол: ПЦР-амплификация	10
Протокол: Электрофорез с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL	13
Протокол: Анализ	27
Программное обеспечение для проведения анализа	28
Контроли	28
Сенсор качества	30
Руководство по поиску и устранению неисправностей	34
Список литературы	36
Приложение А: Интерпретация результатов	37
Информация для заказа	39

Содержимое набора

Набор реагентов Investigator 26plex QS	(100)	(400)
Номер по каталогу	382615	382617
Количество реакций по 25 мкл	100	400
Быстрая реакционная смесь 3.0*	750 мкл	4 x 750 мкл
Вода, очищенная от нуклеаз	1,9 мкл	4 x 1,9 мкл
Смесь праймеров 26plex QS	250 мкл	4 x 250 мкл
Контрольная ДНК 9948 (0,5 нг/мкл)	40 мкл	40 мкл
Аллельная «лестница» 26plex	25 мкл	3 x 25 мкл

*Содержит ДНК-полимеразу, дезоксинуклеотид трифосфатов (dNTP), MgCl₂ и бычий сывороточный альбумин (БСА).

Хранение

Набор реагентов Investigator 26plex QS поставляется с сухим льдом. После получения его следует незамедлительно поместить на хранение в морозильную камеру с постоянной температурой в диапазоне от -30 до -15°C. Следует не допускать повторного оттаивания и замерзания. Смесь праймеров и аллельная «лестница» должны храниться в защищенном от света месте. Образцы ДНК и реагенты для пост-ПЦР (аллельную «лестницу» и размерный стандарт ДНК) следует хранить отдельно от реагентов для ПЦР. При таких условиях компоненты стабильны до окончания срока годности, указанного на наборе реагентов.

После вскрытия упаковки, набор реагентов Investigator 26plex QS следует хранить при температуре 2-8°C максимум 6 месяцев.

Предполагаемое использование

Набор реагентов Investigator 26plex QS предназначен для использования в молекулярной биологии в целях решения криминалистических задач, установления личности и отцовства. Данный продукт не предназначен для диагностики, профилактики и лечения заболеваний.

При работе с данной продукцией следует тщательно соблюдать все надлежащие меры предосторожности. Всем пользователям продукции QIAGEN® рекомендуется следовать руководящим принципам Национального института здравоохранения США (NIH), разработанным для проведения испытаний с использованием рекомбинантной ДНК, и другим действующим основным положениям.

Инструкции по технике безопасности

При работе с химическими веществами всегда используйте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации см. соответствующие паспорта безопасности вещества (ПБВ). Их можно найти, просмотреть и распечатать на веб-сайте в удобном и компактном формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety для каждого набора реагентов QIAGEN и каждого компонента из набора.

Контроль качества

В соответствии с системой менеджмента качества компании «QIAGEN», сертифицированной по ISO, все партии наборов реагентов Investigator 26plex QS проходят проверку на соответствие заранее установленных спецификаций в целях обеспечения стабильного качества продукции. Набор реагентов Investigator 26plex QS отвечает требованиям стандарта ISO 18385.

Введение

Набор реагентов Investigator 26plex QS предназначен для проведения мультиплексной ПЦР в целях решения криминалистических задач, установления личности и отцовства. В ходе ПЦР одновременно амплифицируется 24 полиморфных STR-маркера, представленных ниже, вместе с маркером половой принадлежности - амелогенином.

Смесь праймеров в наборе реагентов Investigator 26plex QS содержит два инновационных внутренних контроля ПЦР (сенсоры качества QS1 и QS2), которые позволяют получить важную информацию об эффективности ПЦР и о наличии ингибиторов ПЦР. Сенсоры качества подвергаются амплификации одновременно с полиморфными STR-маркерами.

Набор реагентов Investigator 26plex QS разработан специально для быстрого и надежного создания профилей ДНК из мазков крови, буккальных мазков и криминалистических образцов. Для набора реагентов используется ПЦР-технология быстрого циклирования компании «QIAGEN», при помощи которой можно выполнять амплификацию приблизительно в течение 65 минут. Данная технология обеспечивает получение надежных результатов и устойчивость к ингибиторам. Праймеры помечают следующими флуоресцентными красителями:

- 6-FAM™: Амелогенин, TH01, D3S1358, Penta D, D6S1043, D21S11
- BTG: TPOX, DYS391, D1S1656, D12S391, Penta E
- BTY: D10S1248, D22S1045, D19S433, D8S1179, D2S1338
- BTR2: D2S441, D18S51, vWa, FGA
- BTP: QS1, D16S539, CSF1PO, D13S317, D5S818, D7S820, QS2

Рекомендуемое количество ДНК при нормальных условиях должно составлять 0,5 нг.

В таблице 1 представлены STR-локусы с генетической картой хромосом и повторяющимися мотивами, соответствующие основным принципам Международного общества судебной генетики (ISFG) в отношении использования микросателлитных маркеров (1).

Для получения информации об известных микровариантах, не содержащихся в аллельной «лестнице» набора реагентов Investigator 26plex, см. веб-сайт Национального института стандартов и технологий (NIST) (strbase.nist.gov/).

Таблица 1. Информация о локусах для набора реагентов Investigator 26plex QS

Локус	Учетный номер в базе данных GenBank®	Повторяющийся мотив ссылочного аллеля	Построение генетических карт хромосом
Амелогенин X	M55418	-	Xp22.1-22.3
Амелогенин Y	M55419	-	Yp11.2
DYS391	AC011302	[TCTA] ₁₁	Yq11.21
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] ₁₆ [TGA][TAGA][TAGG] ₁ [TG] ₅	1q42
D2S441	AL079112	[TCTA] ₁₂	2p14
D2S1338	G08202	[TGCC] ₆ [TTCC] ₁₁	2q35
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	3q25.3
D5S818	G08446	[AGAT] ₁₁	5q23.2
D6S1043	G08539	[AGAT] ₁₁	6q15
D7S820	G08616	[GATA] ₁₂	7q21.11
D8S1179	G08710	[TCTA] ₁₂	8q23.1-23.2
D10S1248	AL391869	[GGAA] ₁₃	10q26.3
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	12p13.2
D13S317	G09017	[TATC] ₁₃	13q31.1
D16S539	G07925	[GATA] ₁₁	16q24.1
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	18q21.3
D19S433	G08036	AAGG[AAAG]AAGGTAGG[AAGG] ₁₁	19q12
D21S11	AP000433	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] ₁₁	21q21.1
D22S1045	AL022314	[ATT] ₁₄ ACT [ATT] ₂	22q12.3
CSF1PO	X14720	[AGAT] ₁₂	5q33.1
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] ₃ TTTTTTCT [CTTT] ₁₃ CTCC [TTCC] ₂	4q28.2
Penta D	AP001752	[AAAGA] ₁₃	21q22.3
Penta E	AC027004	[AAAGA] ₅	15q26.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] ₉	11p15.5
TPOX	M68651	[AATG] ₁₁	2p25.3
vWA	M25858	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	12p13.31

Оборудование и реактивы, поставляемые пользователем

При работе с химическими веществами всегда используйте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации см. соответствующие паспорта безопасности вещества (ПБВ), предоставляемые поставщиком продукта.

Все протоколы

- Формамид Hi-Di™, 25 мл (Applied Biosystems, номер по каталогу 4311320)
- Матричный стандарт ВТ6 для мультикапиллярных приборов, например генетических анализаторов 3500 (см. Информацию о заказе)
- Пипетки и наконечники для пипеток
- Один из следующих анализаторов ДНК:*
 - Генетический анализатор Applied Biosystems® 3500
 - Генетический анализатор Applied Biosystems 3500xL
- Один из следующих термоциклеров для ПЦР:*
 - QIAamplifier 96
 - Rotor-Gene® Q QIAGEN
 - Система для ПЦР GeneAmp® 9700
 - Bio-Rad® PTC-200
 - Biometra® UNO с термоблоком
 - Eppendorf® Mastercycler® ep
 - 96-луночный термоциклер Veriti™ 96-Well Thermal Cycler
 - 96-луночная ПЦР-система ProFlex™ 96-well PCR System
- Пробирки или планшеты для ПЦР
- Микроцентрифуга для пробирок или планшетов для ПЦР
- Размерный стандарт ДНК (ВТО), смотрите информацию по заказу и «Протокол: Анализ» на странице 27.

* Это неполный список поставщиков. В данный список не включено большинство основных поставщиков биологического оборудования.

Пригодность программного обеспечения для анализа продуктов, используемых для установления личности человека

Наборы для ПЦР-установления личности Investigator, предусматривают калибровку с использованием «аллельной лестницы». Поэтому используемое программное обеспечение должно быть совместимо с продуктами, предназначенными для установления личности в рамках криминалистического исследования. Рекомендуется использовать ПО GeneMapper® ID-X. Файлы-шаблоны для набора реагентов Investigator упрощают анализ данных и подходят для этого программного обеспечения.

Протокол: ПЦР-амплификация

Данный протокол предназначен для ПЦР-амплификации STR-локусов из криминалистических образцов, с использованием набора реагентов Investigator 26plex QS.

Рекомендации перед началом использования

- Готовьте все реакционные смеси на поверхности, вдали от той, которая используется для выделения ДНК и анализа продуктов ПЦР (пост-ПЦР-анализ).
- Используйте одноразовые наконечники с гидрофобными фильтрами, чтобы свести к минимуму риск перекрестного загрязнения.
- Рекомендуемое количество ДНК при нормальных условиях должно составлять 0,5 нг.

Необходимые действия перед началом использования

- Перед вскрытием пробирок с компонентами для ПЦР, перемешивайте их на вортексе, а затем некоторое время центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, образовавшееся на дне пробирок.

Порядок работы

1. Разморозьте компоненты для ПЦР и матрицу нуклеиновой кислоты. Тщательно перемешайте. Некоторое время центрифугируйте перед использованием.
2. Подготовьте мастер-микс, как описано в таблице 2. Мастер-микс содержит все компоненты, необходимые для ПЦР, за исключением матрицы (образца) ДНК и воды, очищенной от нуклеаз. Поскольку при переносе может произойти потеря реагентов, приготовьте смесь с учетом проведением дополнительных реакций. Также проводите реакции с использованием положительной и отрицательной контрольной пробы.
3. Тщательно перемешайте, некоторое время центрифугируйте и распределите соответствующие объемы мастер-микса в пробирки для ПЦР или в лунки планшета для ПЦР.
4. Добавьте матрицу ДНК и воду, очищенную от нуклеаз, к мастер-миксу, чтобы получить конечный объем образца 25 мкл.
5. Подготовьте отрицательную и положительную контрольную пробы.
Положительная контрольная проба: Используйте 1 мкл контрольной ДНК (т.е. 0,5 нг).
Отрицательная контрольная проба: Для проведения реакции вместо матрицы ДНК, используйте воду, очищенную от нуклеаз.

Таблица 2. Подготовка к проведению реакции

Компонент	Объем на 1 реакцию
Быстрая реакционная смесь 3.0	7,5 мкл
Смесь праймеров	2,5 мкл
Вода, очищенная от нуклеаз (добавляется на этапе 4)	Варьируется
Матрица ДНК (добавляется на этапе 4)	Варьируется
Общий объем	25 мкл

6. Если матрица ДНК перенесена пипеткой на ободок или пробку пробирки ПЦР, некоторое время центрифугируйте ее, чтобы собрать содержимое, образовавшееся на дне пробирок.
7. Произведите настройку термоциклера в соответствии с инструкциями производителя, принимая во внимание условия, представленные в Таблице 3.

Примечание: Если вы используете термоциклер GeneAmp 9700 с алюминиевым блоком, активируйте «Std Mode» (Стандартный режим). Если вы используете термоциклер с серебряным 96-ти лунковым блоком или с серебряным 96-ти лунковым блоком с позолоченным напылением, активируйте «Max Mode» (Максимальный режим). Не используйте «9600 Emulation Mode» (Режим эмуляции 9600).

8. После завершения процедуры выполнения циклов храните образцы при температуре от -30 до -15°C в месте, защищенном от света, или сразу переходите непосредственно к электрофорезу.

Таблица 3. Стандартная процедура выполнения циклов, рекомендуемая для всех образцов ДНК

Температура	Время	Количество циклов
96°C*	8 мин	-
96°C	10 с	3 цикла
64°C	55 с	
72°C	5 с	27 циклов
96°C	10 с	
61°C	55 с	
72°C	5 с	-
68°C	2 мин	
60°C	2 мин	-
10°C	∞	-

*Горячий старт для активации ДНК полимеразы

Протокол: Электрофорез с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL

Набор реагентов Investigator 26plex QS предназначен для использования с генетическим анализатором 3500/3500xL, который предусматривает следующее программное обеспечение:

- ПО Data Collection серии 3500

Примечание: Для записи данных в надлежащие файлы пользователь должен войти в систему на ПК с правами локального администратора или с соответствующими правами доступа.

Для получения подробной инструкции по настройке и спектральной калибровке прибора, а также по использованию программного обеспечения Data Collection серии 3500 и GeneMapper ID-X компании «Эплайд Биосистемс» (Applied Biosystems), см. *Руководство по эксплуатации генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL (tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4401661.pdf)*.

Генетический анализатор Applied Biosystems 3500 оснащен 8 капиллярами, а генетический анализатор Applied Biosystems 3500xL - 24 капиллярами.

Набор виртуальных фильтров AnyDye используется вместе с 6 флуоресцентными метками: 6-FAM, VTG, VTU, VTR2, VTR и VTO. VT6 - это матричный стандарт.

Материалы, необходимые для проведения электрофореза, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Материалы, необходимые для проведения электрофореза

Материал	Спецификации
Капилляр	Блок длиной 36 см для генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL
Полимер	POP-4® для генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL
Буфер	Контейнер с анодным буфером (КАБ) серии 3500 Контейнер с катодным буфером (ККБ) серии 3500

Спектральная калибровка/Формирование матрицы

Перед проведением анализа размера фрагментов ДНК выполните спектральную калибровку с использованием 6 флуоресцентных меток: 6-FAM, VTG, VTU, VTR2, VTP и VTO для каждого анализатора (Таблица 5). В ходе процедуры калибровки образуется матрица, предназначенная для коррекции перекрывания спектров флуоресценции красителей.

Важная информация! Спектральную калибровку необходимо проводить для каждого нового капиллярного блока. Данная процедура включает следующие этапы:

- Подготовку прибора
- Подготовку стандартного калибровочного планшета
- Настройку планшета и помещение его в прибор
- Установку программного обеспечения для набора красителей VT6
- Выполнение цикла спектральной калибровки
- Проверку матрицы

Подготовка прибора

Перед процедурой спектральной калибровки убедитесь, что выполнена пространственная калибровка. Данная процедура подробно описана в *руководстве по эксплуатации генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL*.

Таблица 5. Шесть флуоресцентных меток VT6

Цвет	Матричный стандарт
Синий (С)	6-FAM
Зеленый (З)	VTG
Желтый (Ж)	VTU
Красный (К)	VTR2
Фиолетовый (Ф)	VTP
Оранжевый (О)	VTO

Подготовка стандартного калибровочного планшета для 8 капилляров (генетический анализатор Applied Biosystems 3500)

1. Перед вскрытием пробирок перемешивайте их на вортексе, а затем некоторое время центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, образовавшееся на дне пробирок.
2. Приготовьте смесь формамида и матричного стандарта ВТ6 в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6. Приготовление смеси формамида и матричного стандарта ВТ6 для 8 капилляров

Компонент	Объем
Формамид Hi-Di	90 мкл
Матричный стандарт ВТ6 для мультикапиллярного прибора	10 мкл

3. Перемешайте смесь на вортексе, а затем некоторое время центрифугируйте ее.
4. Поместите по 10 мкл смеси в каждую из 8 лунок 96-луночного планшета (позиции А1-Н1).
5. Денатурируйте в течение 3 мин при температуре 95°C.
6. Быстро заморозьте, поместив планшет на лед на 3 минуты.
В качестве альтернативы, для охлаждения планшета можно использовать термоциклер, установленный на 4°C.

Подготовка стандартного калибровочного планшета для 24 капилляров (генетический анализатор Applied Biosystems 3500xL)

7. Перед вскрытием пробирок перемешивайте их на вортексе, а затем некоторое время центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, образовавшееся на дне пробирок.
8. Приготовьте смесь формамида и матричного стандарта ВТ6 в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7. Приготовление смеси формамида и матричного стандарта ВТ6 для 24 капилляров

Компонент	Объем
Формамид Hi-Di	225 мкл
Матричный стандарт ВТ6 для мультикапиллярного прибора	25 мкл

9. Перемешайте смесь на вортексе, а затем некоторое время центрифугируйте ее.

11. Поместите по 10 мкл смеси в каждую из 24 лунок 96-луночного планшета (позиции A1-H1, A2-H2 и A3-H3).
12. Денатурируйте в течение 3 мин при температуре 95°C.
13. Быстро заморозьте, поместив планшет на лед на 3 минуты.
В качестве альтернативы, для охлаждения планшета можно использовать термоциклер, установленный на 4°C.

Настройка планшета и помещение его в прибор

Порядок действий подробно описан в *руководстве по эксплуатации генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL*.

Установка программного обеспечения для набора красителей ВТ6

Перед выполнением спектральной калибровки необходимо задать набор красителей для матричного стандарта ВТ6.

1. Чтобы создать новый набор красителей, выберите пункт меню «**Library**» (Библиотека). Зайдите в раздел «Analyze» (Анализировать), чтобы перейти в поле «**Dye Sets**» (Наборы красителей), после чего нажмите кнопку «**Create**» (Создать).
2. Введите данные в поле «Dye Set Name» (Название набора красителей), например «**ВТ6**».
3. В поле «Chemistry» (Химические реактивы) выберите пункт меню «**Matrix Standard**» (Матричный стандарт). Для поля «Dye Set Template» (Шаблон набора красителей) выберите пункт меню «**AnyDye Template**» (Шаблон «AnyDye»).
4. В поле «Calibration Peak Order» (Порядок калибровочных пиков) расположите цвета следующим образом: **6** (синий), **5** (оранжевый), **4** (зеленый), **3** (желтый), **2** (красный) и **1** (фиолетовый).

Примечание: Такой порядок следования пиков является правильным для данного прибора, несмотря на то, что порядок пиков для матричного стандарта ВТ6 другой.

5. Измените настройки в поле «Parameters» (Параметры) следующим образом:
Matrix Condition Number Upper Limit (Верхняя граница числа обусловленности матрицы): **13,5**
Locate Start Point After Scan (Найти начальную точку после сканирования): **1000**
Locate Start Point Before Scan (Найти начальную точку до сканирования): **5000**
Limit Scans To (Предельное количество сканов): **2750**
Sensitivity (Чувствительность): **0,4**
Minimum Quality Score (Наименьший показатель качества): **0,95**
6. Нажмите кнопку «**Save**» (Сохранить), чтобы подтвердить изменения.

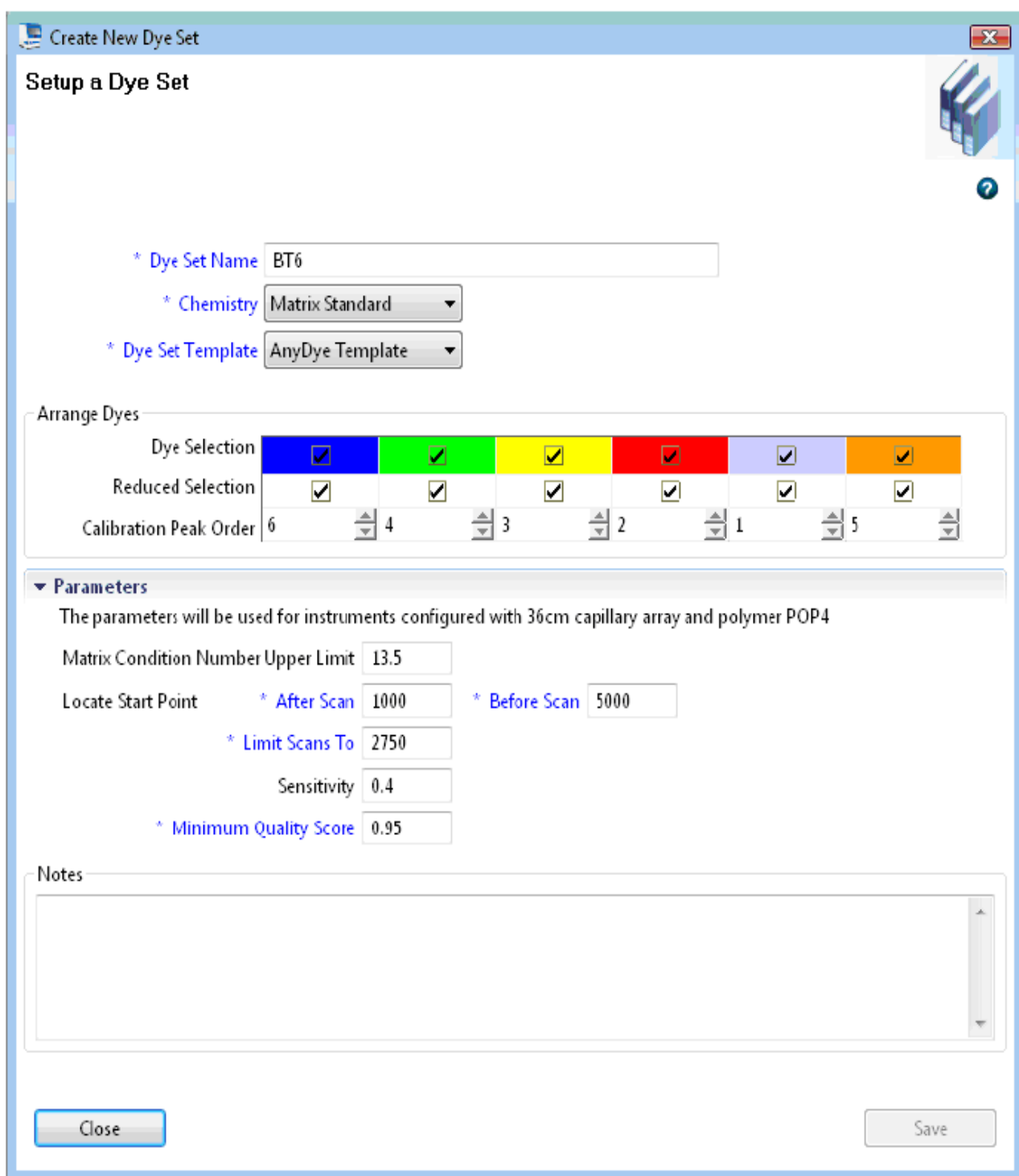


Рисунок 1. Настройка набора красителей для BT6

Выполнение цикла спектральной калибровки

Когда многолуночные планшеты со смесью для спектральной калибровки будут помещены в лоток автоматического дозатора, можно начинать процедуру спектральной калибровки.

1. Чтобы перейти к экрану Spectral Calibration (Спектральная калибровка), выберите поле «**Maintenance**» (Техническое обслуживание) на панели инструментов программного обеспечения Data Collection серии 3500.
2. Чтобы настроить цикл калибровки, перейдите в поле «**Calibrate**» (Калибровка), а затем в поле «**Spectral**» (Спектральная) и выберите пункт меню «**Calibration Run**» (Цикл калибровки).
3. Теперь укажите количество лунок на планшете для спектральной калибровки и его положение в приборе.
4. В поле «Chemistry Standard» (Химический стандарт) выберите пункт «**Matrix Standard**» (Матричный стандарт) и в качестве значения параметра «Dye Set» (Набор красителей) выберите ранее созданный ВТ6 (см. «Установка программного обеспечения для набора красителей ВТ6», стр. 15).
5. **Optional** (Опционально): Включите опцию «**Allow Borrowing**» (Разрешить замену).
6. Нажмите кнопку «**Start Run**» (Запустить цикл).

Проверка матрицы

Чтобы вывести на экран результаты для капилляра под таблицей результатов цикла («Capillary» (Капилляр), «Quality value» (Значение показателя качества) и «Condition number» (Число обусловленности), нажмите кнопку «Capillary» (Капилляр) в таблице.

- Значение показателя качества (значение Q) для каждого капилляра должно быть больше чем 0,95, а число обусловленности (значение C) должно находиться в диапазоне от 1 до 13,5.
- Проверьте образцы матрицы: базовая линия должна быть прямой. Как показано на рисунке 2, для каждого образца матрицы должно быть 6 пиков высотой приблизительно 1000-6000 RFU (относительной единицы флуоресценции).

Примечание: Оптимальный диапазон должен быть от 3000 до 5000 RFU.

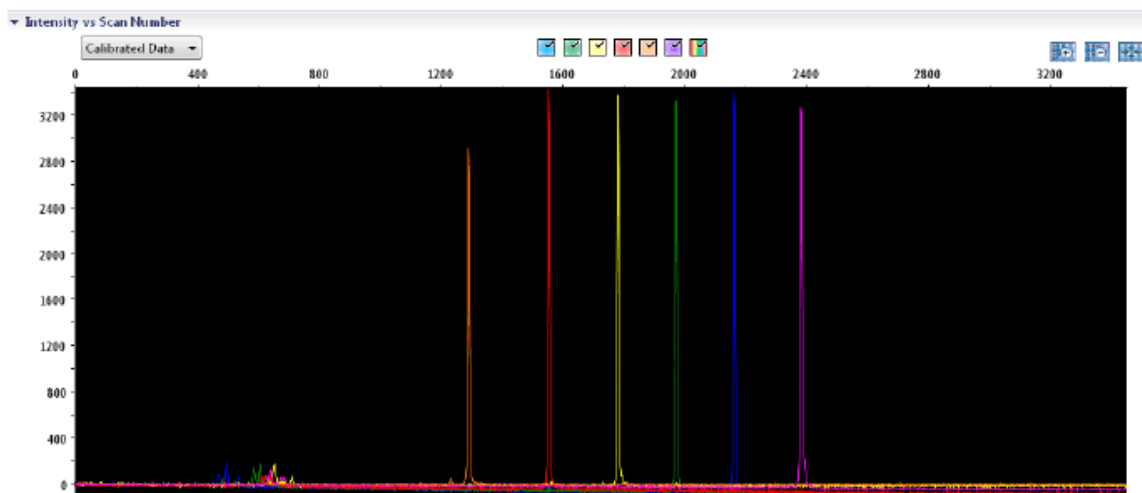


Рисунок 2. Электрофореграмма спектральной калибровки матричного стандарта BT6, полученная на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500.

Если спектральная калибровка будет завершена успешно, то в строке «Overall» (Общие) результаты отобразятся зеленым цветом. Если результаты в строке «Overall» отобразятся красным цветом, то см. раздел «Поиск и устранение неисправностей в ходе спектральной калибровке» *руководства по эксплуатации генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL.*

Capillary Run Data								
Capillary	1	2	3	4	5	6	7	8
Run 1	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Run 2	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated
Run 3	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated	Not Calibrated
Overall	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed

■ Passed
 ■ Failed
 ■ Borrowed
 Not Calibrated

Рисунок 3. Пример успешного выполнения спектральной калибровки матричного стандарта BT6 для всех капилляров на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500.

Для каждого капилляра выберите и выведите на экран данные спектрального анализа и необработанные данные. Убедитесь, что данные отвечают следующим критериям:

- Порядок следования пиков в спектральном профиле слева-направо должен быть следующим: оранжевый-красный-желтый-зеленый-синий-фиолетовый.
- В профиле необработанных данных не должно быть лишних пиков.

- Морфология пиков в спектральном профиле не должна показывать значительные перекрытия, понижения и другие неоднородности. Отдельные пики должны четко отображаться на экране.

Если данные для всех капилляров соответствуют указанным выше критериям, нажмите кнопку «**Accept**» (Принять). Если данные для какого-либо капилляра не отвечают вышепредставленным критериям, нажмите кнопку «**Reject**» (Отклонить) и см. раздел «Поиск и устранение неисправностей в ходе спектральной калибровки» *руководства по эксплуатации генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL*.

Подготовка образцов

1. Перед вскрытием пробирок перемешивайте их на вортексе, а затем некоторое время центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, образовавшееся на дне пробирок.
2. Приготовьте смесь формамида и размерного стандарта ДНК в соответствии с таблицей 8.
3. Перемешайте смесь на вортексе, а затем некоторое время центрифугируйте ее.
4. Перенесите аликвоту объемом 12 мкл смеси в пробирку для каждого анализируемого образца.
5. Добавьте 1 мкл продукта ПЦР или аллельной «лестницы» (при необходимости в разбавленном виде).
6. Денатурируйте в течение 3 мин при температуре 95°C.
7. Быстро заморозьте, поместив планшет на лед на 3 минуты.
8. В качестве альтернативы, для охлаждения планшета можно использовать термоциклер, установленный на 4°C.
9. Поместите образцы на лоток.

Компонент	Объем на один образец
Формамид Hi-Di	12,0 мкл
Размерный стандарт ДНК (ВТО)	0,5 мкл

Примечание: Поскольку введение происходит одновременно во все капилляры, то, как минимум одну (протокол анализа 8 образцов) или три полные колонки (протокол анализа 24 образцов) необходимо переносить пипеткой в планшет мультикапиллярных анализаторов. При анализе меньшего количества образцов пустые позиции необходимо наполнить 12 мкл формамида Hi-Di.

Для обеспечения соответствующего распределения аллелей в мультикапиллярных анализаторах для каждого набора из 24 образцов вводите одну аллельную «лестницу»:

- 8-ми капиллярные приборы: Одна аллельная «лестница» на каждые 3 ввода
- 24-х капиллярные приборы: Одна аллельная «лестница» на каждый ввод

Важная информация: Текущая температура в помещении может повлиять на эксплуатационные характеристики продуктов ПЦР при работе с мультикапиллярными приборами, в результате чего возможно возникновение «плечевых» или «раздвоенных» пиков, в частности при очень низких температурах. **Убедитесь, что температура окружающей среды поддерживается в соответствии с рекомендациями производителя прибора.** Также следите за тем, чтобы буферные растворы были доведены до температуры окружающей среды.

Подготовка цикла

Если вы впервые используете набор реагентов Investigator 26plex QS с генетическим анализатором Applied Biosystems 3500, то сначала необходимо произвести настройку ряда протоколов:

- Протокола работы прибора
- Размерного стандарта
- Протокола контроля качества
- Анализа

Настройку всех протоколов можно произвести при помощи программного обеспечения Data Collection серии 3500 на панели управления.

Протокол работы прибора

1. Чтобы настроить протокол работы прибора, выберите пункт меню «**Library**», а затем зайдите в раздел «**Analyze**», чтобы перейти в поле «**Instrument Protocols**» (Протоколы работы прибора), после чего нажмите кнопку «**Create**».

Примечание: Измените настройки по умолчанию для «Run Module» (Модуля цикла) в области «HID36_POP4», как показано в таблице 9.

2. Введите или выберите значения параметров, указанные в таблице 9.
3. Нажмите кнопку «**Save**», чтобы подтвердить изменения.

Таблица 9. Параметры протокола настройки генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL

Параметр	Настройки 3500	Настройки 3500xL
Область применения	HID	HID
Длина капилляра	36 см	36 см
Полимер	POP4	POP4
Набор красителей	например, VT6	например, VT6
Модуль цикла	HID36_POP4	HID36_POP4
Название протокола	например, Investigator 26plex	например, Investigator 26plex
Температура в термостате (°C)	По умолчанию (60)	По умолчанию (60)
Напряжение цикла (кВ)	13,0	13,0
Напряжение перед циклом (кВ)	По умолчанию (15)	По умолчанию (15)
Напряжение при вводе (кВ)	1,2	1,6
Время выполнения цикла (с)	1550	1550
Время подготовки к циклу (с)	По умолчанию (180)	По умолчанию (180)
Время ввода (с)	30,0*	27,0*
Задержка выдачи данных (с)	По умолчанию (1)	По умолчанию (1)
Дополнительные параметры	По умолчанию	По умолчанию

*Представленные выше настройки указаны в качестве примера. Время ввода может варьироваться в зависимости от типа образцов и количества циклов ПЦР. Время ввода обозначает максимальную продолжительность ввода при заданном напряжении. Если выполняется запись данных для образцов с очень высокой интенсивностью сигнала, то можно выбрать меньшее время ввода, чтобы снизить риск возникновения пиков «пуллап».

Размерный стандарт

- Чтобы настроить размерный стандарт, выберите пункт меню «**Library**», а затем зайдите в раздел «**Analyze**», чтобы перейти в поле «**Size Standards**» (Размерные стандарты), после чего нажмите кнопку «**Create**».

5. Введите или выберите значения параметров, указанные в таблице 10.

Используйте размерный стандарт ДНК 24plex (ВТО) или размерный стандарт ДНК (ВТО) 450 при следующей длине фрагментов:

- **Размерный стандарт ДНК 24plex (ВТО):** 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 и 550 bp (пар оснований)
- **Размерный стандарт ДНК (ВТО) 450:** 60, 80, 100, 140, 180, 200, 220, 260, 300, 340, 360, 400 и 450 bp (пар оснований)

Таблица 10. Параметры размерного стандарта

Параметр	Настройки
Размерный стандарт	например, SST-BTO_60-500bp или SST-BTO_60-450bp
Цвет красителя	Оранжевый

6. В качестве альтернативы, можно импортировать параметры размерного стандарта ДНК, используя рекомендуемые файлы шаблона «Investigator» (Таблица 15).
7. Нажмите кнопку «**Save**», чтобы подтвердить изменения.

Протокол контроля качества

8. Чтобы настроить протокол контроля качества, выберите пункт меню «**Library**», а затем зайдите в раздел «**Analyze**», чтобы перейти в поле «**QC Protocols**» (Протоколы контроля качества), после чего нажмите кнопку «**Create**».
9. Введите или выберите значения параметров, указанные в таблице 11.

Таблица 11. Параметры контроля качества

Параметр	Настройки
Название протокола	например, BTO_550 или BTO_450
Размерный стандарт	SST-BTO_60-500bp или SST-BTO_60-450bp
Программа Sizecaller	SizeCaller v1.1.0

10. Перейдите в раздел «**Analysis Settings**» (Настройки анализа), а затем - в поле «**Peak Amplitude Threshold**» (Порог амплитуды пиков) и убедитесь, что активированы все цвета.
Проверьте, установлены ли настройки анализа, как указано в таблице 14. Для всех остальных настроек должны быть установлены значения «Default» (По умолчанию).
11. Нажмите кнопку «**Save**», чтобы подтвердить изменения.

Анализ

12. Чтобы произвести настройку анализа, выберите пункт меню «**Library**», а затем зайдите в раздел «**Manage**» (Управление), чтобы перейти в поле «**Assays**» (Анализ), после чего нажмите кнопку «**Create**».
13. Чтобы выполнить анализ фрагментов Investigator 26plex, необходимо задать параметры, как указано в таблице 12.
14. Нажмите кнопку «**Save**», чтобы подтвердить изменения.

Таблица 12. Параметры для проведения анализа

Параметр	Настройки
Настройка анализа	например «Investigator 26plex»
Цвет	По умолчанию
Область применения	HID
Протокол работы прибора	например, «Investigator 26plex»
Протоколы контроля качества	например, BTO_550 или BTO_450

Запуск цикла

1. На панели управления нажмите кнопку «**Create New Plate**» (Создать новый планшет).
2. Перейдите в раздел «**Setup**» (Настройка), а затем в поле «**Define Plate Properties**» (Задать свойства планшета) и выберите пункт меню «**Plate Details**» (Сведения о планшете). Выберите или введите параметры, как указано в таблице 13.

Таблица 13. Свойства планшета

Свойство	Настройки
Название	например, Investigator 26plex
Количество лунок	96
Тип планшета	HID
Длина капилляра	36 см
Полимер	POP4

3. Нажмите кнопку «**Assign Plate Contents**» (Назначить содержимое для планшета), чтобы подтвердить изменения.
4. Введите присвоенное название образца для каждой лунки, содержащей образец или аллельную «лестницу». Таким образом, вы сможете идентифицировать позиции лунок для каждого образца при сборе и обработке данных.
5. В поле «Assay» выберите подходящий анализ. Если вы выполнили действия, указанные в разделе «Setting up a run» (Настройка цикла), нажмите кнопку «**Add from Library**» (Добавить из библиотеки) и выберите поле «**Investigator 26plex**» в качестве протокола работы прибора («Instrument Protocol»). Всем назначенным названиям лункам планшета должен быть присвоен соответствующий анализ.
6. Повторите такие же действия, перейдя в разделы «File name conventions» (Указания для присвоения названий файлам) и «Results group» (Группа результатов).
7. Выберите лунки, для которых необходимо указать соответствующий анализ. Поставьте галочки для того, чтобы отметить выбранные лунки в полях: «**Assay**», «**File name conventions**» и «**Results group**».
8. Если такие действия не выполнены, поместите планшет в сборе в прибор и закройте дверцу прибора, чтобы повторно запустить прибор. Затем нажмите кнопку «**Link Plate for Run**» (Привязать планшет к циклу). На появившемся экране введите требуемое название цикла и нажмите кнопку «**Start Run**» (Запустить цикл).

Параметры анализа/Метод анализа

В таблице 14 представлены рекомендуемые параметры анализа, полученные при помощи рабочего инструмента Peak Detector (Детектор пиков).

Таблица 14. Рекомендуемые настройки для генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL

Параметр	Настройки
Алгоритм обнаружения пиков	Расширенный
Диапазоны	Анализ: Часть диапазона Начальная точка: 1000; Точка остановки: 20 000 Определение размера: Все размеры
Сглаживание и установка базовой линии	Сглаживание: Легкое Окно базовой линии: 51 точка
Метод определения размеров	Локальный саузерн-метод
Обнаружение пиков	Пороги амплитуды пиков В:* Y:* G:* R:* P:* O:* Минимальная полуширина пика: 2 точки Степень полинома: 3 Размер окна пиков: 11 точек [†] Порог наклона: 0,0

*Порог (предельное значение) амплитуды пиков соответствует наименьшей высоте пика, обрабатываемой при помощи программного обеспечения GeneMapper *ID-X*. Такие пороговые значения, как правило, составляют 50-200 RFU (относительной единицы флуоресценции) и определяются лабораторией индивидуально.

Рекомендации: Наименьшая высота пиков должна в три раза превышать фоновый шум базовой линии.

[†] Только настройки размера окна пиков отличаются от настроек для HID-анализа, задаваемые компанией «Applied Biosystems», по умолчанию.

Протокол: Анализ

Общие инструкции по автоматическому анализу образцов см. в соответствующем руководстве по использованию программного обеспечения GeneMapper *ID-X*.

Порядок определения точной длины продуктов амплификации зависит от типа прибора, условий электрофореза и используемого размерного стандарта ДНК. Из-за сложной структуры некоторых локусов определение их размера должно осуществляться на основании равномерно распределенных ссылочных указаний. Используйте размерный стандарт ДНК 24plex (ВТО) и размерный стандарт ДНК (ВТО) 450 при следующей длине фрагментов:

Размерный стандарт ДНК 24plex (ВТО): 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 и 550 bp (пар оснований)

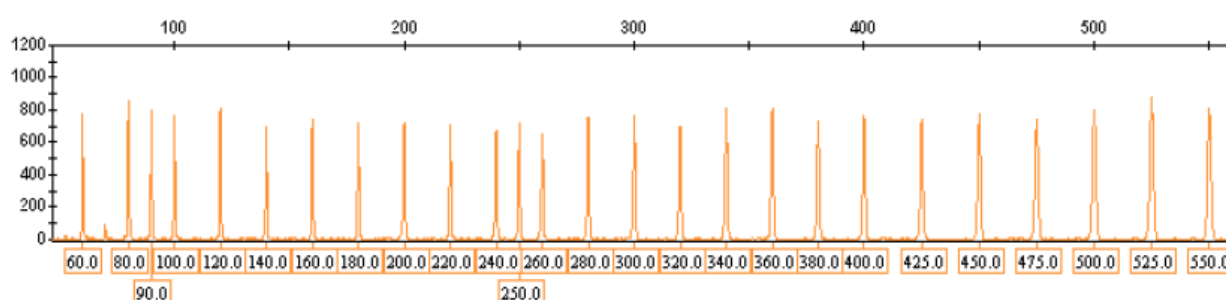


Рисунок 4а. Электрофореграмма размерного стандарта ДНК 24plex (ВТО). Длина фрагментов указана в парах оснований.

Размерный стандарт ДНК (ВТО) 450: 60, 80, 100, 140, 180, 200, 220, 260, 300, 340, 360, 400 и 450 bp (пар оснований)

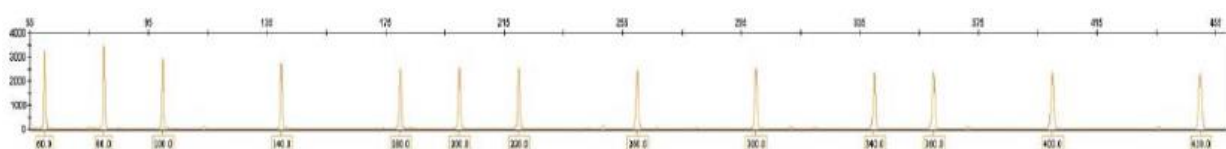


Рисунок 4б. Электрофореграмма размерного стандарта ДНК (ВТО) 450. Длина фрагментов указана в парах оснований.

Программное обеспечение для проведения анализа

Распределение аллелей должно осуществляться с использованием соответствующего программного обеспечения для проведения анализа (например, ПО GeneMapper ID-X) вместе с файлами шаблонов «Investigator», которые доступны на веб-сайте www.qiagen.com.

Таблица 15. Рекомендуемые файлы шаблонов «Investigator» для ПО GeneMapper ID-X

Тип файла	Название файла
Панели*	26plex_Panels
Наборы бинов*	26plex_Bins
Статтер	26plex_Stutter
Размерный стандарт	SST-BTO_60-500bp или SST-BTO_60-450bp
Метод анализа	Analysis_HID_3500_50rfu
	Analysis_HID_3500_200rfu
Настройки построения графика	Plots_6dyes

*Панели и наборы бинов должны использоваться всегда; а другие файлы шаблонов используются опционально.

Контроли

Аллели, представленные в таблице 16, принадлежат контрольной ДНК 9948 (которая поставляется в наборе реагентов Investigator 26plex QS).

Таблица 16. Назначение аллелей для набора реагентов Investigator 26plex QS

Локус	CCR 9948
Амелогенин	X/Y
DYS391	10/10
D1S1656	14/17
D2S441	11/12
D2S1338	23/23
D3S1358	15/17
D5S818	11/13
D6S1043	12/12
D7S820	11/11
D8S1179	12/13
D10S1248	12/15
D12S391	18/24
D13S317	11/11
D16S539	11/11
D18S51	15/18
D19S433	13/14
D21S11	29/30
D22S1045	16/18
CSF1PO	10/11
FGA	24/26
Penta D	8/12
Penta E	11/11
TH01	6/9,3
TPOX	8/9
vWA	17/17

Сенсор качества

Набор реагентов Investigator 26plex QS содержит два инновационных внутренних контроля ПЦР (сенсоры качества QS1 и QS2), которые позволяют получить важную информацию об эффективности ПЦР и о наличии ингибиторов ПЦР. Внутренние сенсоры качества входят в смесь праймеров и подвергаются амплификации одновременно с полиморфными STR-маркерами. Сенсоры качества помечены ВТР и обнаруживаются при наличии фрагментов длиной 74 bp (пары оснований) (QS1) и 435 bp (пары оснований) (QS2).

Для решения проблемы сходства последовательностей и неспецифического связывания создана синтетическая внутренняя контрольная матрица ДНК на основании случайного алгоритма. Последовательность данной матрицы отличается от всех известных последовательностей ДНК и не имеет сходства с ДНК человека. Поэтому вероятность неспецифического связывания в ходе мультиплексной реакции ПЦР-амплификации очень низкая.

В целом, успешная амплификация небольшого сенсора качества (QS1) показывает, что ПЦР была правильно подготовлена и проведена, независимо от того, имелась или отсутствовала ДНК в образце. Если при анализе продуктов амплификации сенсор качества не обнаружен, это означает, что процедура пипетирования при подготовке к ПЦР или сама ПЦР были проведены ненадлежащим образом. В таком случае пользователь должен повторно провести анализ, который покажет правильные результаты.

Анализ по оценки чувствительности показали, что внутренние контроли не влияют на качество выполнения ПЦР. При амплификации небольшого количества матрицы ДНК были получены похожие результаты для смесей праймеров как с использованием сенсоров качества, так и без них.

Помимо этого, анализ двух фрагментов внутреннего контроля (QS1 и QS2) и целевых STR-продуктов амплификации позволяет дифференцированно выявить наличие ингибиторов или деградацию ДНК в ходе реакции амплификации.

В случае деградации образцов, амплификация небольших целевых фрагментов более эффективная, чем амплификация больших целевых фрагментов. Тем не менее, деградация целевой матрицы не препятствует амплификации фрагментов внутреннего контроля из матрицы внутреннего контроля. Таким образом, для небольших целевых STR-продуктов при равном соотношении QS1 и QS2 происходит деградация образца.

Если в образце присутствуют ингибиторы, такие как гетамин и гуминовая кислота, то амплификация менее эффективна и большие фрагменты ДНК амплифицируются хуже, чем небольшие. Если анализ продуктов амплификации показывает недостаточную амплификацию больших целевых STR-последовательностей и большого фрагмента сенсора качества (QS2), а небольшой сенсор качества (QS1) амплифицируется успешно, то вероятнее всего, это значит, что образец загрязнен ингибиторами. Также сдвиг соотношения для небольшого сенсора качества (QS1) означает наличие ингибиторов.

Анализ, проводимый на обнаружение двух сенсоров качества, позволяет пользователю дифференцированно выявлять наличие ингибиторов ПЦР или деградацию криминалистического образца. В результате чего пользователь может получить информацию, необходимую для интерпретации данных и планирования следующих этапов анализа. В таблице 17 кратко представлены возможные профили и пояснения к ним.

Таблица 17. Профили и пояснения к ним

Пики аллелей	QS1	QS2	Пояснение
Есть	Есть	Есть	Успешный профиль
Отсутствует	Есть	Есть	ДНК отсутствует
Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	ПЦР проведена неудачно
Профиль в виде «горнолыжного склона»	Есть	Понижение/Отсутствует	Ингибиторы присутствуют
Профиль в виде «горнолыжного склона»	Есть	Есть	Деградация ДНК

Примечание: В ходе разных анализов высота пиков QS1 и QS2 в незначительной степени может варьироваться. Небольшой разброс высоты пиков представляет собой обычное явление, не зависящее от влияния ингибиторов. В ходе валидации химик-аналитик должен проанализировать обычный спектр вариаций по отношению к определенному типу образцов и определить диапазон высоты обычных пиков для обоих QS.

Если понижение интенсивности сигнала QS2 на 20% ниже от интенсивности сигнала QS1, то это указывает на ингибирование реакции ПЦР.

Аллели

В таблице 18 представлены аллели аллельной «лестницы». Все анализы проводили с использованием полимера POP-4 (см. таблицу 18 и рисунок 5). Использование различных приборов для анализа, размерных стандартов ДНК или полимеров может привести к получению разных значений длины фрагментов. Помимо этого, рекомендуется проводить визуальное сопоставление с аллельной «лестницей».

Определение масштаба

- По горизонтали: 70-450 bp (пар оснований)
- По вертикали: В зависимости от интенсивности сигнала

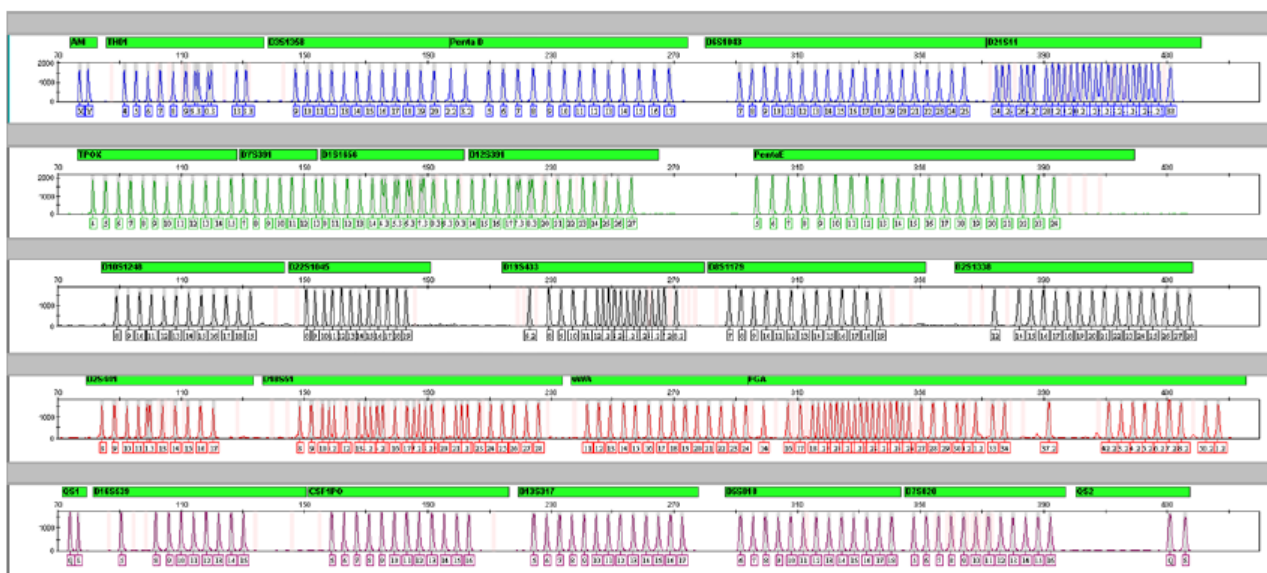


Рисунок 5. Электрофореграмма аллельной «лестницы» 26plex, анализируемой при помощи генетического анализатора Applied Biosystems 3500 xL.

Аллельная «лестница» содержит по два аллеля для каждого сенсора качества (Q1 и Q2). Благодаря чему можно осуществлять автоматическое определение пиков QS в ходе анализа образцов.

Таблица 18. Фрагменты, включенные в аллельную «лестницу» 26plex

Лocus	Метка-краситель	Количество повторений в аллельной «лестнице»
Амелогенин	6-FAM	X, Y
TH01	6-FAM	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 10.3, 11, 13, 13.3
D3S1358	6-FAM	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
Penta D	6-FAM	2.2, 3.2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D6S1043	6-FAM	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25
D21S11	6-FAM	24, 24.2, 25, 26, 26.2, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 36.2, 37, 38
TPOX	BTG	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
DYS391	BTG	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
D1S1656	BTG	10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18, 18.3, 19.3, 20.3
D12S391	BTG	14, 15, 16, 17, 17.3, 18, 18.3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
Penta E	BTG	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D10S1248	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D22S1045	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D19S433	BTY	6.2, 8, 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18.2
D8S1179	BTY	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D2S1338	BTY	12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D2S441	BTR2	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D18S51	BTR2	8, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 17.2, 18, 18.2, 19, 20, 21, 21.2, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
vWA	BTR2	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
FGA	BTR2	14, 16, 17, 18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 33, 34, 37.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2
QS1	BTP	Q, S
D16S539	BTP	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
CSF1PO	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D13S317	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D5S818	BTP	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
D7S820	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
QS2	BTP	Q, S

Для получения информации об известных микровариантах, не содержащихся в аллельной «лестнице» набора реагентов Investigator 26plex, см. веб-сайт Национального института стандартов и технологий (NIST) (strbase.nist.gov).

Руководство по поиску и устранению неисправностей

При возникновении каких-либо проблем, см. данное руководство по поиску и устранению неисправностей. Для получения дополнительной информации также см. страницу веб-сайта «Часто задаваемые вопросы» в разделе «Служба технической поддержки» (www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Специалисты технической службы компании «QIAGEN» всегда готовы ответить на любые ваши вопросы относительно данных и протоколов, содержащихся в настоящем руководстве, а также относительно методик проведения анализов и обработки образцов. Контактная информация нашей компании представлена на веб-сайте www.qiagen.com.

Комментарии и рекомендации

Несбалансированность профилей, низкая интенсивность сигналов

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Несоответствующий объем быстрой реакционной смеси или смеси праймеров | Проверьте процедуру подготовки к проведению реакции и выполните повторно амплификацию. |
| б) Мастер-микс не перемешивали на вортексе перед распределением | Тщательно перемешайте мастер-микс на вортексе и некоторое время центрифугируйте его. |

Уменьшение высоты пиков QS1 и/или QS2 при проведении стандартных анализов

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Небольшой разброс высоты пиков сенсоров качества представляет собой обычное явление, не зависящее от влияния ингибиторов. | В ходе валидации химик-аналитик должен проанализировать обычный спектр вариаций по отношению к определенному типу образцов и определить диапазон высоты обычных пиков для обоих QS. Если понижение интенсивности сигнала QS2 на 20% ниже от интенсивности сигнала QS1, то это указывает на ингибирование реакции ПЦР. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Доминирование пиков сенсоров качества

- | | |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Наблюдается чрезмерное доминирование пиков QS1 и QS2. | В программном обеспечении GeneMapper <i>ID-X</i> в разделе «Display Settings» (Настройки отображения) выберите новый параметр «all-dye range» (диапазон для всех красителей) для увеличения масштаба. После чего отобразится необходимый диапазон для QS1 и QS2.
Важная информация: Помимо этого, зайдите в раздел «Analysis Method Editor» (Редактор метода анализа), чтобы перейти в поле «peak detector» (детектор пиков), а затем задайте размер («Ranges» (Диапазоны); «Sizing» (Определение размера)): 75 → 450. |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Подготовка образцов

- | | |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Увеличьте интенсивность сигналов образцов | Уменьшите объем размерного стандарта ДНК (ВТО) для получения высоты пиков около 500 RFU (относительной единицы флуоресценции).

Очищайте продукты ПЦР перед проведением анализа. Для быстрой и эффективной очистки рекомендуется использовать набор для очистки ПЦР-продуктов MinElute® (номер по каталогу 28004 и 28006). |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Неправильная матричная/спектральная калибровка

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| В ходе текущей матричной/спектральной калибровке между панелями красителей (B, G, Y, R, P, O) присутствуют пики «пуллап». | Данную матрицу не рекомендуется использовать для анализа. Выполните повторно процедуру формирования матрицы/спектральной калибровки. Тщательно соблюдайте протокол при работе с анализатором. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
-

Комментарии и рекомендации

Большое количество пиков в образцах помечено как аллели «вне лестницы»

- a) Размерный стандарт ДНК 24plex (ВТО) или размерный стандарт ДНК (ВТО) 450 не задан или задан неверно. Нажмите на оранжевую иконку «Size Match Editor» (Редактор сопоставления размеров), расположенную на верхней панели инструментов ПО GeneMapper ID или GeneMapper ID-X. Отметьте оранжевые фрагменты всех образцов.
- При работе с ПЦР-наборами для установления личности человека всегда используйте размерный стандарт ДНК 24plex (ВТО) или размерный стандарт ДНК (ВТО) 450.
- b) Интенсивность сигналов слишком высокая. Если высота пиков образцов выходит за пределы диапазона линейного детектирования при использовании генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL, может возрасти количество статтеров, раздвоенных пиков и артефактов. Постепенно уменьшайте время ввода минимум до 1 секунды; уменьшайте количество продукта ПЦР-амплификации, используемого для анализа, или уменьшайте количество ДНК для ПЦР.
- c) В результате образования пузырьков в капилляре на всех цветовых панелях появляются пики «пуллап» («вершины»), которые приводят к ошибочным обозначениям аллелей. Повторно выполните процедуру электрофореза, чтобы подтвердить результаты. Проверьте, какое максимальное количество вводов рекомендовано производителем прибора. При необходимости установите новый капиллярный блок.
- d) Различия в работе капилляров мультикапиллярного анализатора в ходе выполнения цикла могут приводить к смещению распределения аллелей. Для надлежащего распределения аллелей в мультикапиллярных анализаторах необходимо выполнить цикл с использованием нескольких аллельных «лестниц».
- e) Низкая температура воздуха в помещении или низкая температура буферов для капиллярного электрофореза (CE) может привести к смещению миграции фрагментов или образованию пиков «вне аллельной лестницы». Убедитесь, что температура окружающей среды поддерживается в соответствии с рекомендациями производителя прибора. Также следите за тем, чтобы буферные растворы были доведены до температуры окружающей среды. Производитель прибора рекомендует предварительно нагревать прибор для капиллярного электрофореза (CE) (~30 мин).

Ненадлежащий ввод/несоответствующий файл аллельной «лестницы»

- a) Дополнительный сигнал может быть определен как пик аллельной «лестницы» из-за сбоя в ходе электрофореза. При неправильном определении пиков аллельной «лестницы», такую «лестницу» не рекомендуется использовать для проведения анализа. Выполните другой ввод/используйте другой файл аллельной «лестницы» и проверьте анализируемые размеры, полученные из размерного стандарта аллельной «лестницы» (в парах оснований). Всегда используйте размерный стандарт ДНК 24plex (ВТО) или размерный стандарт ДНК (ВТО) 450 при работе с ПЦР-наборами для установления личности Investigator.
- b) Один из пиков аллельной «лестницы» находится ниже значения детектирования пиков (50-200 RFU) в ходе проведения анализа и, следовательно, не может быть определен. Аллельную «лестницу» необходимо поместить в анализатор в большей концентрации по сравнению с концентрацией анализируемых образцов. В качестве альтернативы, можно проанализировать данные аллельной «лестницы» с более низким значением детектирования пиков в программном обеспечении, используемом для анализа.
- c) Один из пиков аллельной «лестницы» не определяется, поскольку находится за пределами ожидаемого диапазона размеров, предусмотренного программным обеспечением (в парах оснований). Сравните длину фрагментов (в парах оснований) первого аллеля, представленного в таком же цвете, что и аллельная «лестница» с соответствующим значением, отображаемым в определенной группе. Затем сравните данное значение со значениями других аллелей.
- d) Точечные аллели не найдены. Точечные аллели - это аллели, отличающиеся от следующего целочисленного аллеля как минимум на 1 bp. Проверьте настройки метода анализа. Уменьшите значение в поле «Peak Window Size» (Размер окна пиков) до 11 точек.

Список литературы

1. Бар В. и соавт., (1997 г.) Рекомендации по анализу ДНК: Дополнительный отчет Комиссии по анализу ДНК при Международном обществе судебной генетики (ISFG) относительно использования систем коротких tandemных повторов. Международный журнал по судебной медицине. **110**, 175-176.

Приложение А: Интерпретация результатов

После ПЦР-анализа и автоматического назначения аллелей с использованием соответствующего программного обеспечения необходимо провести точный и надежный дискриминантный анализ в отношении аллелей.

Общий порядок проведения анализа

1. Проверьте размерный стандарт ДНК.
2. Проверьте аллельную «лестницу».
3. Проверьте положительную и отрицательную контрольные пробы.
4. Проанализируйте и оцените данные для образца.

Пики «пуллап»

Пики «пуллап» могут появиться, если высота пиков находится вне диапазона линейного детектирования (см. «Руководство по поиску и устранению неисправностей») или если используется ненадлежащая матрица. Они появляются на определенных позициях в разных цветовых каналах и, как правило, им присуща более низкая интенсивность сигнала. Во избежание появления пиков «пуллап», необходимо, чтобы высота пиков не превышала пороговые значения.

Статтер-пики

Возникновение статтер-пиков обусловлено последовательностью структуры повторов и количеством аллелей. Пики $n - 4$ (n минус 4) появляются в результате потери единицы повтора в ходе амплификации тетрануклеотидных STR-мотивов и явления «проскальзывания» *Taq* ДНК-полимеразы. Пики $n - 3$ появляются в ходе амплификации тринуклеотидного STR-мотива D22S1045. Данные пики следует интерпретировать с использованием файлов шаблонов «Investigator» программного обеспечения GeneMapper *ID-X*.

Добавление нуклеотидов, независимое от шаблонов

В результате активности терминальной трансферазы, *Taq* ДНК-полимераза может вызывать неполное аденилирование к 3'-концу амплифицированных фрагментов ДНК. Артефактный пик представляет собой одно основание, которое короче ожидаемого (пики -1). Все праймеры, входящие в набор реагентов Investigator 26plex QS, разработаны таким образом, чтобы свести к минимуму наличие таких артефактов. Высота артефактных пиков зависит от количества ДНК. Лаборатории должны самостоятельно определять предельные значения для анализа пиков.

Артефакты

Температура в помещении может повлиять на эксплуатационные характеристики продуктов ПЦР при работе с мультикапиллярными приборами, в результате чего возможно возникновение «плечевых» или «раздвоенных» пиков. При появлении «плечевых» или «раздвоенных» пиков рекомендуется повторно выполнить ввод образца. Убедитесь, что температура окружающей среды поддерживается в соответствии с рекомендациями производителя прибора. Также следите за тем, чтобы буферные растворы были доведены до температуры окружающей среды.

Приложение В: Изменение объемов для проведения ПЦР с использованием набора реагентов Investigator 26plex QS

Набор реагентов Investigator 26plex QS предусматривает использование половинного объема реакционных смесей (быстрой реакционной смеси + смеси праймеров). Следует учитывать, что, несмотря на то, что нами успешно проведены испытания с использованием меньшего объема реакционной смеси, все же наилучшие результаты испытания достигаются при использовании полных реакционных объемов, рекомендуемых в руководстве по использованию набора реагентов.

Информация для заказа

Продукт	Содержимое	Номер по каталогу
Набор реагентов Investigator 26plex QS (100)	Смесь праймеров, быстрая реакционная смесь, включая <i>Taq</i> ДНК-полимеразу, контрольную ДНК, аллельную «лестницу» 26plex и воду, очищенную от нуклеаз	382615
Набор реагентов Investigator 26plex QS (400)	Смесь праймеров, быстрая реакционная смесь, включая <i>Taq</i> ДНК-полимеразу, контрольную ДНК, аллельную «лестницу» 26plex и воду, очищенную от нуклеаз	382617
Сопутствующие продукты		
Матричный стандарт ВТ6 (50)	Матричный стандарт для 6-FAM, VTG, VTU, VTR2, VTP и VTO и генетических анализаторов Applied Biosystems 3500	386224
Размерный стандарт ДНК 450 (ВТО) (100)	Размерный стандарт ДНК с 13 фрагментами на 100 реакций	386045
Размерный стандарт ДНК 24plex (ВТО) (100)	Размерный стандарт ДНК с 26 фрагментами на 100 реакций	386035
ПЦР-наборы для установления личности человека		
Набор реагентов Investigator Quantiplex Pro (200)	Используется с системами Applied Biosystems 7500 в режиме реального времени. Реакционная смесь Quantiplex Pro, смесь праймеров Quantiplex Pro, контрольная ДНК Quantiplex Pro M1, буфер для разведения нуклеиновых кислот QuantiTect	387216

Для получения новейшей информации относительно лицензии и заявлений об отказе от ответственности на продукт см. соответствующее руководство по использованию набора реагентов QIAGEN или руководство пользователя. Руководство по использованию набора реагентов QIAGEN и руководство пользователя доступны на веб-сайте www.qiagen.com. В случае их отсутствия, обратитесь в службу технического обслуживания компании «QIAGEN» или к вашему региональному дистрибьютору.

Журнал регистрации изменений в документе

Дата	Изменения
08/2019	Первый выпуск
06/2021	Изменены условия хранения вскрытого набора (стр. 4), изменена таблица 3. Обновлен раздел «Информация для заказа». В раздел «Оборудование и реагенты, поставляемые пользователем» добавлены «96-луночный термоциклер Veriti», «96-луночная ПЦР-система ProFlex» и «QIAamplifier 96». Редакционные и версточные изменения.

Ограниченное лицензионное соглашение в отношении использования набора реагентов Investigator 26plex QS

При использовании данного продукта покупатель или пользователь продукта соглашается с представленными ниже условиями настоящего Соглашения:

1. Продукт можно использовать исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к данному продукту, и настоящим руководством, а также только с компонентами, которые входят в набор реагентов. Компания «QIAGEN» не предоставляет никаких лицензий (на использование объекта права интеллектуальной собственности) на использование или объединение компонентов, прилагаемых к данному набору реагентов, с какими-либо компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, предоставляемых вместе с продуктом, настоящим руководством и дополнительными протоколами, доступными на веб-сайте www.qiagen.com. Некоторые из таких дополнительных протоколов предоставляются пользователям продукции компании «QIAGEN» от других пользователей продукции компании «QIAGEN». Такие протоколы не были проверены или одобрены компанией «QIAGEN». Компания «QIAGEN» не заверяет и не гарантирует, что они не нарушают прав третьих лиц.
2. Помимо официально заявленных лицензий, компания «QIAGEN» не предоставляет никаких гарантий относительно того, что данный набор реагентов и/или его использование не нарушают прав третьих лиц.
3. Данный набор реагентов и его компоненты имеют лицензию на одноразовое использование и не подлежат повторному использованию, повторной модернизации или повторной продаже.
4. Компания «QIAGEN» отказывается от всех прочих лицензий, прямо выраженных или подразумеваемых, кроме тех, которые заявлены официально.
5. Покупатель и пользователь данного набора реагентов обязуются не совершать и не допускать совершения другими лицами каких-либо действий, которые могут привести к любым деяниям, запрещенным выше, или способствовать им. Компания «QIAGEN» может требовать исполнения запретов, предусмотренных настоящим Ограниченным лицензионным соглашением, в судебном порядке, и получение возмещения всех понесенных ею следственных и судебных издержек, включая расходы на юридические услуги, по любому иску, направленному на исполнение настоящего Ограниченного лицензионного соглашения или любого из своих прав на интеллектуальную собственность, связанных с использованием набора реагентов и/или его компонентов.

Обновленные условия лицензии см. на сайте по адресу www.qiagen.com.

Товарные знаки: QIAGEN®, Sample to Insight®, Investigator®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); Applied Biosystems®, FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, Hi-Di™, POP-4® (компания «Thermo Fisher Scientific») или ее дочерние компании); Biometra® (компания «Biometra Biomedizinische Analytik GmbH»); Bio-Rad® (компания «Bio-Rad Laboratories, Inc.»); Eppendorf®, Mastercycler® (компания «Eppendorf AG»); GenBank® (Министерство здравоохранения и социальных служб США.). Зарегистрированные наименования, товарные знаки и т.д., используемые в настоящем документе, даже если они специально не помечены как таковые, не должны рассматриваться как не защищенные законом.

06.2021 г. НВ-2681-001 © 2021 QIAGEN. Все права сохранены.

Примечания

Примечания

Техническая поддержка qiagenrus@qiagen.com | Веб-сайт <https://www.qiagen-hid.ru>

