

---

Апрель 2019 г.

# Investigator<sup>®</sup> 24plex GO!

## Руководство

Для мультиплексной амплификации основных локусов, фиксируемых CODIS; европейского стандартного набора локусов, а также локусов SE33, DYS391 и амелогенина

---

## Содержание

Комплектация набора.....	3
Хранение .....	3
Назначение продукта .....	4
Информация по технике безопасности.....	4
Контроль качества .....	4
Введение .....	5
Оборудование и реактивы, обеспечиваемые пользователем .....	9
Важные замечания .....	11
Протокол: ПЦР-амплификация из образцов крови на пластинках FTA и других бумажных пластинках.....	12
Протокол: ПЦР-амплификация из буккальных клеток на пластинках FTA и других бумажных пластинках.....	16
Протокол: ПЦР-амплификация из буккальных клеток, полученных с помощью устройств для сбора буккального эпителия Vode Buccal DNA Collector.....	20
Протокол: ПЦР-амплификация из лизатов, полученных из буккальных мазков.....	24
Протокол: Электрофорез с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer .....	27
Спектральная калибровка/Формирование матрицы .....	28
Подготовка образцов.....	35
Подготовка цикла.....	36
Запуск цикла .....	41
Параметры анализа/Метод анализа .....	42
Протокол: анализ.....	43
Программное обеспечение для анализа .....	43
Контроли .....	44
Сенсор качества.....	46
Аллели.....	50
Руководство по поиску и устранению неполадок.....	53
Цитируемая литература.....	57
Приложение А: Интерпретация результатов.....	58

Приложение В: Изменение объемов ПЦР с использованием набора Investigator 24plex GO! Kit.....	60
Информация для заказа.....	62
История изменения .....	64

## Комплектация набора

<b>Investigator 24plex GO! Kit</b>	<b>(200)</b>	<b>(1000)</b>
<b>№ по каталогу</b>	<b>382426</b>	<b>382428</b>
<b>Количество реакций</b>	<b>200</b>	<b>1000</b>
Fast Reaction Mix 2.0*	2 × 750 мкл	10 × 750 мкл
Primer Mix 24plex GO!	2 × 1250 мкл	10 × 1250 мкл
Control DNA 9948 (5 нг/мкл)	50 мкл	50 мкл
DNA size standard 24plex (BTO)	110 мкл	5 × 110 мкл
Allelic ladder 24plex	2 × 25 мкл	6 × 25 мкл
Quick-Start Protocol	1	1

\* Содержит ДНК-полимеразу, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> и бычий сывороточный альбумин (БСА).

## Хранение

Набор Investigator 24plex GO! Kit поставляется на сухом льду. При получении его следует незамедлительно поместить на хранение в морозильную камеру с постоянной температурой в диапазоне от –30 до –15 °С. Не допускайте повторного оттаивания и замораживания. Смесь праймеров и аллельный лэддер подлежат хранению в защищенном от света месте. Образцы ДНК и реактивы, используемые после ПЦР (аллельный лэддер и стандарт длины ДНК), необходимо хранить отдельно от реактивов для ПЦР. В указанных условиях компоненты сохраняют стабильность в течение срока годности, указанного на упаковке набора.

После вскрытия упаковки набор Investigator 24plex GO! Kit подлежит хранению при температуре 2–8 °С не более 6 месяцев.

---

## Назначение продукта

Набор Investigator 24plex GO! Kit предназначен для использования в молекулярной биологии в целях решения криминалистических задач, установления личности, а также установления отцовства. Данный продукт не предназначен для диагностики, профилактики, а также лечения заболеваний.

При работе с продуктами следует тщательно соблюдать все надлежащие меры предосторожности. Всем пользователям продукции QIAGEN рекомендуется следовать директивам Национального института здравоохранения США (National Institute of Health, NIH), разработанным для опытов с рекомбинантной ДНК, и другим действующим методическим указаниям.

## Информация по технике безопасности

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Дополнительную информацию см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ). Для каждого набора QIAGEN и каждого компонента набора их можно найти, просмотреть и распечатать на веб-сайте по адресу [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), где они размещены в удобном и компактном формате PDF.

## Контроль качества

В рамках сертифицированной по ISO системы управления качеством компании QIAGEN каждая партия наборов Investigator 24plex GO! Kits проходит проверку на соответствие определенным параметрам в целях обеспечения стабильного качества продукции Investigator 24plex GO! соответствуют требованиям стандарта ISO 18385.

# Введение

Набор Investigator 24plex GO! Kit предназначен для проведения мультиплексной ПЦР в целях решения криминалистических задач, установления личности, а также установления отцовства. В ходе такой ПЦР одновременно амплифицируется 22 полиморфных STR-маркера, перечисленных ниже, а также маркер амелогенин, используемый для определения половой принадлежности донора образца. Эти 22 маркера рекомендованы Рабочей группой по определению основных локусов CODIS (Combined DNA Index System — Комбинированная индексная система ДНК), Европейской сетью судебно-экспертных учреждений (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI) и Европейской группой ДНК-профилирования (European DNA Profiling Group, EDNAP).

Набор Investigator 24plex GO! Kit содержит два инновационных внутренних контроля ПЦР (сенсоры качества QS1 и QS2), которые позволяют получить важную информацию об эффективности ПЦР и о присутствии ингибиторов ПЦР. Сенсоры качества подвергаются амплификации одновременно с полиморфными STR-маркерами.

Набор Investigator 24plex GO! Kit разработан специально для быстрой прямой амплификации ДНК из клеток крови и буккальных клеток на пластинках FTA® и других бумажных пластинках, а также из буккальных мазков. В наборе используется технология проведения ПЦР быстрым циклированием от QIAGEN, которая позволяет выполнить амплификацию приблизительно за 45 минут. Можно использовать кружки, вырезанные из пластинок FTA и других пластинок из фильтровальной бумаги, без предварительной обработки. Для буккальных мазков быстрый и удобный протокол с лизированием позволяет получить неочищенный лизат для амплификации приблизительно за 5 минут. Праймеры помечены следующими флуоресцентными красителями:

- 6-FAM™: амелогенин, TH01, D3S1358, vWA, D21S11
- BTG: TPOX, DYS391, D1S1656, D12S391, SE33
- BTY: D10S1248, D22S1045, D19S433, D8S1179, D2S1338
- BTR2: D2S441, D18S51, FGA
- BTP: QS1, D16S539, CSF1PO, D13S317, D5S818, D7S820, QS2

Рекомендуемое количество образца — один кружок диаметром 1,2 мм (для пластинок FTA и других пластинок из фильтровальной бумаги) либо 2 мкл лизата, полученного из буккального мазка.

Набор Investigator 24plex GO! Kit прошел валидацию с использованием системы для ПЦР GeneAmp® PCR System 9700 (с серебряным 96-луночным блоком с золотым напылением) и генетического анализатора Applied Biosystems® 3500™.

В Таблица 1 показаны STR-локусы (с указанием расположения на хромосоме и повторяющихся мотивов), соответствующие рекомендациям Международного общества судебной генетики (International Society for Forensic Genetics, ISFG) в отношении использования микросателлитных маркеров (1).

Об известных микровариантах, не содержащихся в аллельном лэддере Investigator 24plex, см. на веб-сайте Национального института стандартов и технологий (National Institute of Standards and Technology, NIST) по адресу: [www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

**Таблица 1. Локус-специфическая информация для набора Investigator 24plex GO! Kit**

Локус	Учетный номер в GenBank®	Повторяющийся мотив референсного аллеля	Расположение в хромосоме
Амелогенин X-связанный	M55418	–	Xp22.1-22.3
Амелогенин Y-связанный	M55419	–	Yp11.2
DYS391	AC011302	[TCTA] <sub>11</sub>	Yq11.21
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] <sub>16</sub> [TGA][TAGA][TAGG] <sub>1</sub> [TG] <sub>5</sub>	1q42
D2S441	AL079112	[TCTA] <sub>12</sub>	2p14
D2S1338	G08202	[TGCC] <sub>6</sub> [TTCC] <sub>11</sub>	2q35
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>15</sub>	3p25.3
D5S818	G08446	[AGAT] <sub>11</sub>	5q23.2
D7S820	G08616	[GATA] <sub>12</sub>	7q21.11
D8S1179	G08710	[TCTA] <sub>12</sub>	8q23.1-23.2
D10S1248	AL391869	[GGAA] <sub>13</sub>	10q26.3
D12S391	G08921	[AGAT] <sub>5</sub> GAT [AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT	12p13.2
D13S317	G09017	[TATC] <sub>13</sub>	13q31.1
D16S539	G07925	[GATA] <sub>11</sub>	16q24.1
D18S51	L18333	[AGAA] <sub>13</sub>	18q21.3
D19S433	G08036	AAGG [AAAG] AAGG TAGG [AAGG] <sub>11</sub>	19q12

См. продолжение таблицы на следующей странице

Продолжение таблицы, начало см. на предыдущей странице

Локус	Учетный номер в GenBank®	Повторяющийся мотив референсного аллеля	Расположение в хромосоме
D21S11	AP000433	[TCTA] <sub>4</sub> [TCTG] <sub>6</sub> [TCTA] <sub>3</sub> TA [TCTA] <sub>3</sub> TCA [TCTA] <sub>2</sub> TCCATA [TCTA] <sub>11</sub>	21q21.1
D22S1045	AL022314	[ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub>	22q12.3
CSF1PO	X14720	[AGAT] <sub>12</sub>	5q33.1
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] <sub>3</sub> TTTTTTCT [CTTT] <sub>13</sub> CTCC [TTCC] <sub>2</sub>	4q28.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] <sub>9</sub> AA [AAAG] <sub>16</sub>	6q14.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] <sub>9</sub>	11p15.5
TPOX	M68651	[AATG] <sub>11</sub>	2p25.3
vWA	M25858	TCTA [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>13</sub>	12p13.31



# Оборудование и реактивы, обеспечиваемые пользователем

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

## Все протоколы

- Формамид Hi-Di™ Formamide, 25 мл (Applied Biosystems, № по кат. 4311320)
- Matrix Standard ВТ6 для многокапиллярных приборов, напр. генетических анализаторов 3500
- Пипетки и наконечники для пипеток
- Один из следующих анализаторов ДНК:\*
  - Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer
  - Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer
- Один из следующих термоциклеров для ПЦР:\*
  - QIAGEN's Rotor-Gene® Q
  - GeneAmp PCR System 9700
  - Bio-Rad® PTC-200
  - Biometra UNO-Thermoblock
  - Eppendorf® Mastercycler® ep
- Пробирки или планшеты для ПЦР
- Микроцентрифуга для пробирок или планшетов для ПЦР

\* Представленный перечень поставщиков не является полным, в него не включены многие крупные производители биологического оборудования.

---

Для протоколов, предусматривающих использование клеток крови или буккальных клеток на бумажных пластинках

- Uni-Core Punch 1,2 mm (GE Healthcare, № по кат. WB100028) или 1,2 mm Aluminum Micro-Punch with Mat (GE Healthcare, № по кат. WB100005)

Для протоколов, предусматривающих использование буккальных клеток на бумажных пластинках

- Investigator STR GO! Punch Buffer (1000) или (200) (QIAGEN, № по кат. 386528 или 386526)

Для протокола, предусматривающего использование буккальных клеток на устройствах для сбора буккального эпителия Bode Buccal DNA Collector™

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (QIAGEN, № по кат. 386516)

Для протоколов, предусматривающих использование лизатов, полученных из буккальных мазков

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (QIAGEN, № по кат. 386516)
- Микроцентрифужные пробирки 2 мл
- Шейкер для микроцентрифужных пробирок 2 мл

Пригодность программного обеспечения для анализа для продуктов, используемых с целью установления личности

Наборы для ПЦР Investigator Human Identification PCR Kits, предназначенные для установления личности, требуют калибровки с помощью аллельного лэддера. Поэтому используемое программное обеспечение должно быть совместимо с продуктами, предназначенными для установления личности в рамках криминалистического анализа. Рекомендуется использовать GeneMapper® ID-X. Файлы шаблонов Investigator облегчают анализ данных и подходят для использования с этим программным обеспечением.

---

## Важные замечания

Лабораторные условия, указанные в протоколах, признаны оптимальными для получения наилучших результатов. Однако число циклов ПЦР может быть разным в зависимости от материала, используемого в качестве образца. Такая коррекция позволяет обеспечить максимально высокие показатели успеха уже после первого раунда. Рекомендуется проводить анализ репрезентативной партии образцов, чтобы убедиться в том, что количества циклов, предусмотренные протоколом, оптимальны. Увеличьте количество циклов на один, если сигналы на полученных электрофореграммах слишком слабые. Увеличьте количество циклов на один, если сигналы на полученных электрофореграммах слишком интенсивные.

---

# Протокол: ПЦР-амплификация из образцов крови на пластинках FTA и других бумажных пластинках

Этот протокол предназначен для прямой ПЦР-амплификации STR-локусов из образцов крови на кружках, вырезанных из пластинок FTA и других бумажных пластинок, с использованием набора Investigator 24plex GO! Kit.

## Важные замечания перед началом работы

- Подготовьте все реакционные смеси в зоне, отделенной от зоны, используемой для выделения ДНК и анализа продуктов ПЦР (пост-ПЦР-зоны).
- Используйте одноразовые наконечники с гидрофобными фильтрами для сведения к минимуму перекрестного загрязнения.

## Необходимые действия перед началом процедуры

- Перед открыванием пробирок с компонентами ПЦР перемешивайте их содержимое вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, осевшее на дно.

## Порядок работы

1. Вырежьте из центра пятна крови кружок диаметром 1,2 мм с помощью подходящего инструмента (напр., пробойника Uni-Core Punch производства GE Healthcare).

**Важно!** Не используйте более одного кружка за один раз.

2. Приготовьте мастер-микс согласно Таблица 2, стр. 15.

---

Поскольку возможна потеря реактивов при переносе, приготовьте смесь с учетом возможных дополнительных реакций. Необходимо также учесть реакции с положительным и отрицательным контролями. Мастер-микс содержит все компоненты, необходимые для ПЦР, кроме матричной ДНК (ДНК образца).

3. Тщательно перемешайте реакционную смесь и внесите 20 мкл (или 23 мкл при использовании дополнительного буфера Investigator STR GO! Punch Buffer, № по кат. 386526 или 386528) в пробирки для ПЦР или лунки планшета для ПЦР.

4. Перенесите по одному кружку 1,2 мм в каждую емкость с реакционной смесью.

**Примечание.** Не перемешивайте смесь после переноса в нее диска.

5. Подготовьте положительный и отрицательный контроли.

**Положительный контроль:** используйте 2 мкл (т. е. 10 нг) контрольной ДНК.

**Примечание.** В случае если сигналы слишком слабые или слишком интенсивные, может потребоваться коррекция количества контрольной ДНК после задания оптимального числа циклов ПЦР в вашей лаборатории. Не вносите пустой кружок в лунку с положительным контролем.

**Отрицательный контроль:** Не добавляйте матричную ДНК. Не вносите пустой кружок, а также воду в ПЦР-пробирку или лунку с отрицательным контролем.

6. Кратковременно центрифугируйте емкости с реакционной смесью, чтобы обеспечить полное погружение кружков в смесь.

- 
7. Запрограммируйте термоциклер согласно инструкциям изготовителя и с соблюдением условий, указанных в Таблица 3, стр. 15.

**Примечание.** При использовании термоциклера GeneAmp 9700 с алюминиевым блоком применяйте режим «Std Mode» (Стандартный режим), а при использовании этой системы с серебряным блоком или серебряным блоком с золотым напылением — режим «Max Mode» (Режим максимума). Не используйте режим «9600 Emulation Mode» (Режим эмуляции 9600).

8. По завершении выполнения протокола циклирования поместите образцы на хранение в защищенное от света место с температурой от  $-15$  до  $-30$  °C или сразу перейдите к электрофорезу.

**Таблица 2. Приготовление мастер-микса:**

Компонент	Объем на одну реакцию
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 мкл
Primer Mix	12,5 мкл
Общий объем	20,0 мкл

**Примечание.** Если кровь на FTA-образцах хранилась течение более длительного времени, рекомендуется использовать буфер Investigator STR GO! Punch Buffer, чтобы компенсировать возможное ингибирование. На каждую реакцию следует добавлять 3 мкл буфера Investigator STR GO! Punch Buffer.

**Таблица 3. Протокол циклирования для образцов крови на пластинках FTA и других бумажных пластинках**

Температура	Время	Количество циклов
98 °C*	30 с	
64 °C	40 с	3 цикла
72 °C	5 с	
96 °C	10 с	
61 °C	40 с	22 цикла
72 °C	5 с	
68 °C	2 мин	–
60 °C	2 мин	–
10 °C	∞	–

\* Горячий старт для активации ДНК-полимеразы.

---

# Протокол: ПЦР-амплификация из буккальных клеток на пластинках ФТА и других бумажных пластинках

Этот протокол предназначен для прямой ПЦР-амплификации STR-локусов из буккальных клеток на кружках, вырезанных из пластинок ФТА и других бумажных пластинок, с использованием набора Investigator 24plex GO! Kit. (Об устройствах для сбора буккального эпителия Vode Buccal DNA Collector см. в разделе «Протокол: ПЦР-амплификация из буккальных клеток, полученных с помощью устройств для сбора буккального эпителия Vode Buccal DNA Collector», стр. 20.)

## Важные замечания перед началом работы

- Подготовьте все реакционные смеси в зоне, отделенной от зоны, используемой для выделения ДНК и анализа продуктов ПЦР (пост-ПЦР-зоны).
- Используйте одноразовые наконечники с гидрофобными фильтрами для сведения к минимуму перекрестного загрязнения.

## Необходимые действия перед началом процедуры

- Перед открыванием пробирок с компонентами ПЦР перемешивайте их содержимое вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, осевшее на дно.



## Порядок работы

1. Вырежьте кружок диаметром 1,2 мм с помощью подходящего инструмента (напр., пробойника Uni-Core Punch производства GE Healthcare).

**Примечание.** При работе с буккальными клетками, собранными с помощью устройства Whatman® EasiCollect®, вырежьте кружок из области белого цвета. Этот цвет указывает на успешный перенос образца.

**Важно!** Не используйте более одного кружка за один раз.

2. Приготовьте мастер-микс согласно Таблица 4, стр. 19.

Поскольку возможна потеря реактивов при переносе, приготовьте смесь с учетом возможных дополнительных реакций. Необходимо также учесть реакции с положительным и отрицательным контролями. Мастер-микс содержит все компоненты, необходимые для ПЦР, кроме матричной ДНК (ДНК образца).

3. Тщательно перемешайте реакционную смесь и внесите 22 мкл в пробирки для ПЦР или лунки планшета для ПЦР.

4. Перенесите по одному кружку 1,2 мм в каждую емкость с реакционной смесью.

**Примечание.** Не перемешивайте смесь после переноса в нее диска.

5. Приготовьте положительный и отрицательный контроли.

**Положительный контроль:** используйте 1 мкл (т. е. 5 нг) контрольной ДНК.

**Примечание.** В случае если сигналы слишком слабые или слишком интенсивные, может потребоваться коррекция количества контрольной ДНК после задания оптимального числа циклов ПЦР в вашей лаборатории. Не вносите пустой кружок в лунку с положительным контролем.

**Отрицательный контроль:** Не добавляйте матричную ДНК. Не вносите пустой кружок, а также воду в ПЦР-пробирку или лунку с отрицательным контролем.

6. Кратковременно центрифугируйте емкости с реакционной смесью, чтобы обеспечить полное погружение кружков в смесь.

- 
7. Запрограммируйте термоциклер согласно инструкциям изготовителя и с соблюдением условий, указанных в Таблица 5, стр. 19.

**Примечание.** При использовании термоциклера GeneAmp 9700 с алюминиевым блоком применяйте режим «Std Mode» (Стандартный режим), а при использовании этой системы с серебряным блоком или серебряным блоком с золотым напылением — режим «Max Mode» (Режим максимума). Не используйте режим «9600 Emulation Mode» (Режим эмуляции 9600).

8. По завершении выполнения протокола циклирования поместите образцы на хранение в защищенное от света место с температурой от  $-15$  до  $-30$  °C или сразу перейдите к электрофорезу.

**Таблица 4. Приготовление мастер-микса:**

Компонент	Объем на одну реакцию
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 мкл
Primer Mix	12,5 мкл
Investigator STR GO! Punch Buffer	2,0 мкл
Общий объем	22,0 мкл

**Таблица 5. Протокол циклирования для буккальных клеток на пластинках FTA и других бумажных пластинках**

Температура	Время	Количество циклов
98 °C*	30 с	
64 °C	40 с	3 цикла
72 °C	5 с	
96 °C	10 с	
61 °C	40 с	23 цикла
72 °C	5 с	
68 °C	2 мин	–
60 °C	2 мин	–
10 °C	∞	–

\* Горячий старт для активации ДНК-полимеразы.

---

# Протокол: ПЦР-амплификация из буккальных клеток, полученных с помощью устройств для сбора буккального эпителия Bode Buccal DNA Collector

Этот протокол предназначен для прямой ПЦР-амплификации STR-локусов из буккальных клеток на устройствах для сбора буккального эпителия Bode Buccal DNA Collector с использованием набора Investigator 24plex GO! Kit.

## Важные замечания перед началом работы

- Подготовьте все реакционные смеси в зоне, отделенной от зоны, используемой для выделения ДНК и анализа продуктов ПЦР (пост-ПЦР-зоны).
- Используйте одноразовые наконечники с гидрофобными фильтрами для сведения к минимуму перекрестного загрязнения.

## Необходимые действия перед началом процедуры

- Перед открыванием пробирок с компонентами ПЦР перемешивайте их содержимое вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, осевшее на дно.

## Порядок работы

1. Вырежьте кружок диаметром 1,2 мм из концевой части (скругленного конца) устройства Bode Buccal DNA Collector с помощью подходящего инструмента (напр., пробойника Uni-Core производства GE Healthcare) и поместите кружок в лунку планшета для ПЦР 0,2 мл или пробирку для ПЦР 0,2 мл.

**Важно!** Не используйте более одного кружка за один раз, для одной лунки или одной пробирки.

2. Нанесите 2 мкл буфера для лизирования из набора Investigator STR GO! Kit прямо на кружок 1,2 мм. При необходимости кратковременно центрифугируйте смесь, для того чтобы кружок и буфер опустились на дно лунки планшета или пробирки.
3. Инкубируйте образец при температуре 95 °С в течение 5 минут. Не герметизируйте планшет.

**Примечание.** Буфер для лизирования испарится.

4. Приготовьте мастер-микс согласно Таблица 6, стр. 23. Тщательно перемешайте реакционную смесь.

Поскольку возможна потеря реактивов при переносе, приготовьте смесь с учетом возможных дополнительных реакций. Необходимо также учесть реакции с положительным и отрицательным контролями. Мастер-микс содержит все компоненты, необходимые для ПЦР, кроме матричной ДНК (ДНК образца).

5. После инкубации внесите по 20 мкл мастер-микса в каждую лунку планшета для ПЦР или каждую пробирку для ПЦР, содержащую кружок 1,2 мм.

**Примечание.** Не перемешивайте реакционную смесь после внесения мастер-микса.

6. Приготовьте положительный и отрицательный контроли.

**Положительный контроль:** используйте 2 мкл (т. е. 10 нг) контрольной ДНК.

**Примечание.** В случае если сигналы слишком слабые или слишком интенсивные, может потребоваться коррекция количества контрольной ДНК после задания оптимального числа циклов ПЦР в вашей лаборатории. Не вносите пустой кружок в лунку с положительным контролем.

**Отрицательный контроль:** Не добавляйте матричную ДНК. Не вносите пустой кружок, а также воду в ПЦР-пробирку или лунку с отрицательным контролем.

- 
7. Кратковременно центрифугируйте емкости с реакционной смесью, чтобы обеспечить полное погружение кружков в смесь.
  8. Запрограммируйте термоциклер согласно инструкциям изготовителя и с соблюдением условий, указанных в Таблица 7, стр. 23.

**Примечание.** Если используется система для ПЦР GeneAmp PCR System 9700 с алюминиевым термоблоком, установите режим «Std Mode» (Стандартный режим). Если используется система с серебряным блоком или серебряным блоком с золотым напылением, установите режим «Max Mode» (Режим максимума). Не используйте режим «9600 Emulation Mode» (Режим эмуляции 9600).

9. По завершении выполнения протокола циклирования поместите образцы на хранение в защищенное от света место с температурой от  $-15$  до  $-30$  °C или сразу перейдите к электрофорезу.

**Таблица 6. Приготовление мастер-микса:**

Компонент	Объем на одну реакцию
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 мкл
Primer Mix	12,5 мкл
Общий объем	20,0 мкл

**Таблица 7. Протокол циклирования для образцов на устройствах для сбора буккального эпителия Vode Buccal DNA Collector**

Температура	Время	Количество циклов
98 °C*	30 с	3 цикла
64 °C	40 с	
72 °C	5 с	
96 °C	10 с	24 цикла
61 °C	40 с	
72 °C	5 с	
68 °C	2 мин	–
60 °C	2 мин	–
10 °C	∞	–

\* Горячий старт для активации ДНК-полимеразы.

---

# Протокол: ПЦР-амплификация из лизатов, полученных из буккальных мазков

Этот протокол предназначен для прямой ПЦР-амплификации STR-локусов из неочищенных лизатов, полученных из буккальных мазков, с использованием набора Investigator 24plex GO! Kit.

## Важные замечания перед началом работы

- Подготовьте все реакционные смеси в зоне, отделенной от зоны, используемой для выделения ДНК и анализа продуктов ПЦР (пост-ПЦР-зоны).
- Используйте одноразовые наконечники с гидрофобными фильтрами для сведения к минимуму перекрестного загрязнения.

## Необходимые действия перед началом процедуры

- Перед открыванием пробирок с компонентами ПЦР перемешивайте их содержимое вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, осевшее на дно.

## Порядок работы

1. Поместите мазок в микроцентрифужную пробирку 2 мл.

Осторожно срежьте, отломите или выдвиньте вперед концевую часть мазка.

**Примечание.** Приготовьте пустой мазок в качестве отрицательного контроля.

2. Добавьте к образцу 500 мкл буфера для лизирования STR GO! Lysis Buffer.
3. Инкубируйте смесь в течение 5 мин при температуре 95 °С, встряхивая в термомиксере со скоростью 1200 об/мин.

**Необязательно:** Инкубируйте смесь в течение 5 мин при комнатной температуре, встряхивая в термомиксере со скоростью 1200 об/мин.



4. Приготовьте мастер-микс согласно Таблица 8, стр. 26.

Поскольку возможна потеря реактивов при переносе, приготовьте смесь с учетом возможных дополнительных реакций. Необходимо также учесть реакции с положительным и отрицательным контролями. Мастер-микс содержит все компоненты, необходимые для ПЦР, кроме матричной ДНК (ДНК образца).

5. Тщательно перемешайте реакцию смесь и внесите 20 мкл в пробирки для ПЦР или лунки планшета для ПЦР.
6. Тщательно перемешайте лизат, полученный из мазка, и перенесите по 2 мкл лизата прямо в каждую емкость с реакционной смесью.
7. Приготовьте положительный и отрицательный контроли.

**Положительный контроль:** используйте 1 мкл (т. е. 5 нг) контрольной ДНК.

**Примечание.** В случае если сигналы слишком слабые или слишком интенсивные, может потребоваться коррекция количества контрольной ДНК после задания оптимального числа циклов ПЦР в вашей лаборатории. Не вносите пустой кружок в лунку с положительным контролем.

**Отрицательный контроль:** используйте лизат, полученный из пустого мазка.

8. Запрограммируйте термоциклер согласно инструкциям изготовителя и с соблюдением условий, указанных в Таблица 9, стр. 26.

**Примечание.** При использовании термоциклера GeneAmp 9700 с алюминиевым блоком применяйте режим «Std Mode» (Стандартный режим), а при использовании этой системы с серебряным блоком или серебряным блоком с золотым напылением — режим «Max Mode» (Режим максимума). Не используйте режим «9600 Emulation Mode» (Режим эмуляции 9600).

9. По завершении выполнения протокола циклирования поместите образцы на хранение в защищенное от света место с температурой от  $-15$  до  $-30$  °C или сразу перейдите к электрофорезу.

**Таблица 8. Приготовление мастер-микса:**

Компонент	Объем на одну реакцию
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 мкл
Primer Mix	12,5 мкл
Общий объем	20,0 мкл

**Таблица 9. Протокол циклирования для лизатов, полученных из буквальных мазков**

Температура	Время	Количество циклов
98 °C*	30 с	
64 °C	40 с	3 цикла
72 °C	5 с	
96 °C	10 с	
61 °C	40 с	24 цикла
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 Genetic Analyzer

Набор Investigator 24plex GO! Kit валидирован для использования на генетическом анализаторе 3500/3500xL, для которого требуется программное обеспечение 3500 Series Data Collection Software v1 или v2 либо HID Updater 3500 Data Collection Software v2.0.

**Примечание.** Для записи данных в надлежащие файлы необходимо войти в систему на ПК в качестве локального администратора или с аналогичными правами доступа.

Подробные инструкции по настройке приборов, спектральной калибровке, а также по использованию программного обеспечения Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Software v1 или v2, а также GeneMapper *ID-X* Software v1.2 см. в *Руководстве пользователя генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*. Система с 8 капиллярами — это Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer; система с 24 капиллярами — это генетический анализатор Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer.

Набор виртуальных фильтров AnyDye используется при совместном применении 6 флуоресцентных меток: 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP и BTO. Это матричный стандарт BТ6.

Материалы, необходимые для электрофореза, указаны в Таблица 10

**Таблица 10. Материалы, необходимые для электрофореза**

Компонент	Объем на одну реакцию
Капиллярный блок	Блок 36 см для генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Полимер	POP-4™ для генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Буфер	Контейнер с анодным буфером (Anode Buffer Container, ABC) 3500 Series Контейнер с катодным буфером (Cathode Buffer Container, CBC) 3500 Series

## Спектральная калибровка/Формирование матрицы

Перед выполнением анализа размера фрагментов ДНК проведите спектральную калибровку с использованием 6 флуоресцентных меток (6-FAM, VTG, VTU, VTR2, VTP и VTO) для каждого анализатора (Таблица 11, стр. 29).

В ходе процедуры калибровки создается матрица, предназначенная для корректировки перекрытия спектров испускания флуоресценции красителей.

**Важно!** Спектральную калибровку необходимо проводить для каждого нового капиллярного блока. Эта процедура состоит из следующих этапов:

- Подготовка прибора
- Подготовка стандартного калибровочного планшета
- Сборка планшета и его установка в прибор
- Настройка программного обеспечения для набора красителей VT6
- Выполнение цикла спектральной калибровки
- Проверка матрицы

## Подготовка прибора

Перед процедурой спектральной калибровки убедитесь, что выполнена пространственная калибровка. Эта процедура подробно описана в *Руководстве пользователя генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide)*.

**Таблица 11. 6 флуоресцентных меток ВТ6**

Цвет	Матричный стандарт
Синий (B)	6-FAM
Зеленый (G)	BTG
Желтый (Y)	BTY
Красный (R)	BTR2
Фиолетовый (P)	BTP
Оранжевый (O)	BTO

Подготовка стандартного калибровочного планшета для 8 капилляров (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)

1. Перед открыванием пробирок перемешивайте их содержимое вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, осевшее на дно.
2. Приготовьте смесь формамида и Matrix Standard ВТ6 согласно Таблица 12.

**Таблица 12. Приготовление смеси формамида Matrix Standard ВТ6 для 8 капилляров**

Компонент	Объем
Формамид Hi-Di Formamide	90 мкл
Matrix Standard ВТ6 для многокап. приборов	10 мкл

3. Перемешайте смесь вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте ее.

4. Внесите по 10 мкл смеси в каждую из 8 лунок на 96-луночном планшете (позиции А1–Н1).
5. Денатурируйте в течение 3 мин при температуре 95 °С.
6. Быстро заморозьте, поместив планшет на лед на 3 мин.  
Вместо этого можно охладить планшет с помощью термоциклера, установленного на 4 °С.

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

1. Перед открыванием пробирок перемешивайте их содержимое вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, осевшее на дно.
2. Приготовьте смесь формамида и Matrix Standard ВТ6 согласно Таблица 13.

**Таблица 13. Приготовление смеси формамида и Matrix Standard ВТ6 для 24 капилляров**

Компонент	Объем
Формамид Hi-Di Formamide	225 мкл
Matrix Standard ВТ6 для многокап. приборов	25 мкл

3. Перемешайте смесь вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте ее.
4. Внесите по 10 мкл смеси в каждую из 24 лунок на 96-луночном планшете (позиции А1–Н1, А2–Н2 и А3–Н3).
5. Денатурируйте в течение 3 мин при температуре 95 °С.
6. Быстро заморозьте, поместив планшет на лед на 3 мин.  
Вместо этого можно охладить планшет с помощью термоциклера, установленного на 4 °С.

### Сборка планшета и его установка в прибор

Эта процедура подробно описана в *Руководстве пользователя генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User)*.

## Настройка программного обеспечения для набора красителей BT6

Перед выполнением спектральной калибровки необходимо задать в качестве набора красителей Matrix Standard BT6.

1. Чтобы создать новый набор красителей, выберите пункт меню «Library» (Библиотека). В области «Analyze» (Анализ) перейдите в раздел «Dye Sets» (Наборы красителей) и нажмите «Create» (Создать).
2. Введите имя в поле «Dye Set Name» (Имя набора красителей), например «BT6».
3. В области «Chemistry» (Химические реактивы) выберите пункт меню «Matrix Standard» (Матричный стандарт). Для параметра «dye set template» (шаблон набора красителей) выберите значение «AnyDye Template» (Шаблон AnyDye).
4. В области «Calibration Peak Order» (Порядок калибровочных пиков) расположите цвета следующим образом: 6 – синий, 5 – оранжевый, 4 – зеленый, 3 – желтый, 2 – красный, 1 – фиолетовый.

**Примечание.** Такая настройка порядка следования пиков является правильной для данного прибора, несмотря на то, что порядок пиков BT6 иной.

5. Измените настройки в области «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
  - Чувствительность: 0,4
  - Minimum Quality Score (Наименьший показатель качества): 0,95
6. Нажмите «Save» (Сохранить) для подтверждения изменений.

Create New Dye Set

### Setup a Dye Set

\* Dye Set Name:

\* Chemistry:

\* Dye Set Template:

Arrange Dyes

Dye Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Reduced Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Calibration Peak Order	6	4	3	2	1	5

Parameters

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

Matrix Condition Number Upper Limit:

Locate Start Point: \* After Scan  \* Before Scan

\* Limit Scans To:

Sensitivity:

\* Minimum Quality Score:

Notes

Рис. 1. Настройка для набора красителей BT6



## Выполнение цикла спектральной калибровки

Когда многолуночные планшеты со смесью для спектральной калибровки будут помещены в лоток автосамплера, можно начать процедуру спектральной калибровки.

1. Чтобы перейти к экрану спектральной калибровки, выберите «Maintenance» (Техническое обслуживание) на панели инструментов программного обеспечения 3500 Series Data Collection Software.
2. Чтобы настроить цикл калибровки, перейдите в область «Calibrate» (Калибровка), а затем в раздел «Spectral» (Спектральная) и выберите пункт меню «Calibration Run» (Цикл калибровки).
3. Необходимо указать количество лунок на планшете для спектральной калибровки и положение в приборе.
4. В области «Chemistry Standard» (Химический стандарт) выберите пункт «Matrix Standard» (Матричный стандарт) и в качестве значения параметра «Dye Set» (Набор красителей) выберите, например, созданный ранее набор ВТ6 (см. «Настройка программного обеспечения для набора красителей ВТ6», стр. 31).
5. Необязательно: Включите опцию «Allow Borrowing» (Разрешить заимствование).
6. Нажмите «Start Run» (Запустить цикл).

## Проверка матрицы

Нажмите на капилляр в таблице, чтобы вывести на экран результаты для этого капилляра под таблицей результатов цикла (капилляр, значение показателя качества и число обусловленности).

- Значение показателя качества (значение Q) для каждого капилляра должно быть больше 0,95, а число обусловленности (значение C) должно находиться в диапазоне от 1 до 13,5.
- Проверьте образцы матрицы: базовая линия должна быть плоской. Как показано на рисунке, должно присутствовать 6 пиков высотой приблизительно 1000–6000 RFU для каждого образца с матрицей (**примечание:** оптимальный диапазон: 3000–5000 RFU).

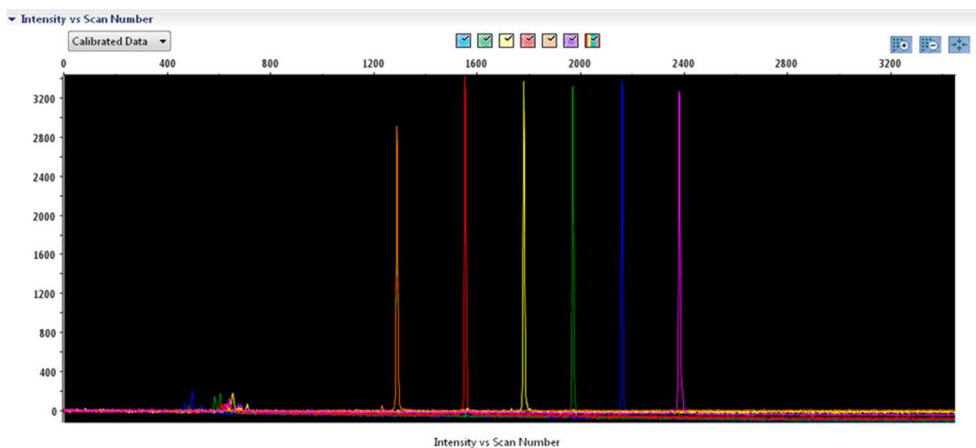


Рис. 2. Электрофореграмма спектральной калибровки Matrix Standard BT6 на Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Когда спектральная калибровка будет успешно завершена, результаты отобразятся в строке «Overall» (Общие) в зеленом цвете. Если результаты в строке «Overall» (Общие) отобразились в красном цвете, см. раздел «Поиск и устранение неполадок при спектральной калибровке» *Руководства пользователя генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer.*

▼ Capillary Run Data

Capillary	1	2	3	4	5	6	7	8
Run 1	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Run 2	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Run 3	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Overall	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed

■ Passed   
 ■ Failed   
 ■ Borrowed   
  Not Calibrated

Рис. 3. Пример успешного выполнения спектральной калибровки Matrix Standard BT6 для всех капилляров на Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

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 посторонних пиков
- Морфология пиков в спектральном профиле должна быть лишена значительных перекрываний, понижений и других перепадов. Должны быть видны отдельные четкие пики

Если данные для всех капилляров соответствуют указанным выше критериям, нажмите «Асерт» (Принять). Если данные для какого-либо капилляра не отвечают критериям выше, нажмите «Reject» (Отклонить) и см. раздел «Поиск и устранение неполадок при спектральной калибровке» *Руководства пользователя генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer.*

## Подготовка образцов

1. Перед открыванием пробирок перемешивайте их содержимое вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте, чтобы собрать содержимое, осевшее на дно.
2. Приготовьте смесь формамида и стандарта длины ДНК согласно Таблица 14.
3. Перемешайте смесь вихревым способом, а затем кратковременно центрифугируйте ее.
4. Внесите аликвоту смеси объемом 12 мкл в пробирку для каждого образца, подлежащего анализу.
5. Добавьте 1 мкл продукта ПЦР или аллельного лэддера (при необходимости разбавив его).
6. Денатурируйте в течение 3 мин при температуре 95 °С.
7. Быстро заморозьте, поместив планшет на лед на 3 мин.  
Вместо этого можно охладить планшет с помощью термоциклера, установленного на 4 °С.
8. Установите образцы на лоток.

**Таблица 14. Приготовление смеси формамида и стандарта длины ДНК**

Компонент	Объем на один образец
Формамид Hi-Di Formamide	12,0 мкл
Стандарт длины ДНК DNA Size Standard 24plex (ВТО)	0,5 мкл

**Примечание.** Поскольку материал вводится одновременно во все капилляры, в планшеты многокапиллярных анализаторов необходимо вносить пипеткой не менее 1 полной колонки (протокол для 8 образцов) или 3 полных колонок (протокол для 24 образцов) материала. При анализе меньшего количества образцов пустые позиции необходимо заполнить 12 мкл формамида Hi-Di Formamide.

Для обеспечения надежного назначения аллелей на многокапиллярных анализаторах вводите один аллельный лэддер для каждого набора из 24 образцов:

- 8-капиллярные приборы: один аллельный лэддер на каждые 3 введения
- 24-капиллярные приборы: один аллельный лэддер на каждое введение

**Важно!** Текущая температура в помещении может повлиять на функциональные характеристики продуктов ПЦР при работе с многокапиллярными приборами, поэтому возможно возникновение «плечевых», или раздвоенных, пиков, особенно при относительно низких температурах. **Убедитесь, что условия окружающей среды поддерживаются в диапазонах, рекомендованных изготовителем прибора.** Необходимо также обеспечить доведение буферов до температуры окружающего воздуха.

## Подготовка цикла

Если набор Investigator 24plex GO! Kit используется на Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer впервые, необходимо сначала настроить ряд протоколов.

- 
- Протокол работы прибора
  - Стандарт длины
  - Протокол контроля качества
  - Анализ

Все протоколы можно настроить с помощью панели инструментов программного обеспечения 3500 Series Data Collection Software.

### Протокол работы прибора

1. Чтобы настроить протокол работы прибора, выберите пункт меню «Library» (Библиотека), в области «Analyze» (Анализ). Затем войдите в раздел «Instrument Protocols» (Протоколы работы прибора) и нажмите «Create» (Создать).

**Примечание.** Поменяйте настройки по умолчанию для модуля цикла в области «NID36\_POP4», как показано в Таблица 15.

2. Необходимо ввести или выбрать значения параметров, указанные в Таблица 15.
3. Нажмите «Save» (Сохранить) для подтверждения изменений.

**Таблица 15. Параметры протокола работы прибора для генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL**

Параметр	Настройка 3500	Настройка 3500xL
Область применения	HID (Установление личности)	HID (Установление личности)
Capillary Length (Длина капилляра)	36 см	36 см
Полимер	POP4	POP4
Dye Set (Набор красителей)	напр., BT6	напр., BT6
Run Module (Модуль цикла)	HID36_POP4	HID36_POP4
Protocol Name (Имя протокола)	напр., «Investigator 24plex»	напр., «Investigator 24plex»
Oven Temperature (°C) (Температура в термостате, °C)	По умолчанию, 60	По умолчанию, 60
Run Voltage (kV) (Напряжение цикла, кВ)	13,0	13,0
PreRun Voltage (kV) (Напряжение перед циклом, кВ)	По умолчанию, 60	По умолчанию, 60
Injection Voltage (kV) (Напряжение при введении, кВ)	1,2	1,6
Run Time (s) (Время выполнения цикла, с)	1550	1550
PreRun Time (s) (Время подготовки к циклу, с)	По умолчанию, 60	По умолчанию, 60
Injection Time (s) (Время введения, с)	30,0*	33,0*
Data Delay (s) (Задержка выдачи данных, с)	По умолчанию, 60	По умолчанию, 60
Advanced Options (Дополнительные параметры)	По умолчанию	По умолчанию

\* При отступлении от стандартных настроек время введения может варьироваться в диапазоне от 1 до 35 с в зависимости от типа образца. Если выполняется запись данных для образцов с очень высокой интенсивностью сигнала, можно задать меньшее время введения. При работе с образцами с низким содержанием ДНК может потребоваться время введения до 35 с.

## Стандарт длины

1. Чтобы задать стандарт длины, выберите пункт меню «Library» (Библиотека), в области «Analyze» (Анализ). Затем войдите в раздел «Size Standards» (Стандарты длины) и нажмите «Create» (Создать).
2. Необходимо ввести или выбрать значения параметров, указанные в Таблица 16. Стандарт длины ДНК 24plex (ВТО) следует использовать при следующей длине фрагментов: 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 п. о.
3. Вместо этого можно импортировать параметры стандарта длины ДНК DNA Size Standard 24plex (ВТО), используя рекомендованный файл шаблона Investigator «SST-ВТО\_60-500bp» (Таблица 21, стр. 44).
4. Нажмите «Save» (Сохранить) для подтверждения изменений.

**Таблица 16. Параметры стандарта длины**

Параметр	Настройка
Size Standard (Стандарт длины)	Напр., SST-ВТО_60-500bp
Dye Color (Цвет красителя)	Orange (оранжевый)

## Протокол контроля качества

1. Чтобы настроить протокол контроля качества, выберите пункт меню «Library» (Библиотека), в области «Analyze» (Анализ). Затем войдите в раздел «QC Protocols» (Протоколы контроля качества) и нажмите «Create» (Создать).
2. Необходимо ввести или выбрать значения параметров, указанные в Таблица 17.

**Таблица 17. Параметры протокола контроля качества**

Параметр	Настройка
Protocol Name (Имя протокола)	напр., BTO_550
Стандарт длины	SST-BTO_60-500bp
Sizecaller (Программа для определения размера)	SizeCaller v1.1.0

3. Перейдите в область «Analysis Settings» (Настройки анализа), а затем — в область «Peak Amplitude Threshold» (Порог амплитуды пиков) и убедитесь, что активированы все цвета.

Проверьте, установлены ли рекомендованные настройки анализа (см. Таблица 20 на стр. 42). Для всех остальных настроек должны быть установлены значения по умолчанию.

4. Нажмите «Save» (Сохранить) для подтверждения изменений.

## Анализ

1. Чтобы задать тест-систему, выберите пункт меню «Library» (Библиотека), в области «Manage» (Управление). Затем войдите в раздел «Assays» (Тест-системы) и нажмите «Create» (Создать).
2. Для выполнения анализа фрагментов Investigator 24plex необходимо задать параметры из Таблица 18.
3. Нажмите «Save» (Сохранить) для подтверждения изменений.

**Таблица 18. Параметры тест-системы**

Параметр	Настройка
Assay Name (Имя тест-системы)	напр., «Investigator 24plex»
Color (Цвет)	По умолчанию
Application Type (Область применения)	HID (Установление личности)
Instrument Protocol (Протокол работы прибора)	напр., «Investigator 24plex»
QC Protocols (Протоколы контроля качества)	напр., BTO_550



## Запуск цикла

1. На панели инструментов нажмите «Create New Plate» (Создать новый планшет).
2. Перейдите в область «Setup» (Настройка), а затем в область «Define Plate Properties» (Задать свойства планшета) и выберите пункт меню «Plate Details» (Сведения о планшете). Выберите или введите параметры, указанные в Таблица 19.

**Таблица 19. Свойства планшета**

Свойство	Настройка
Name (Имя)	напр., «Investigator 24plex»
Number of Wells (Количество лунок)	96
Plate Type (Тип планшета)	HID (Установление личности)
Capillary Length (Длина капилляра)	36 см (36 см)
Polymer (Полимер)	POP4

3. Нажмите «Assign Plate Contents» (Назначить содержимое для планшета), чтобы подтвердить изменения.
4. Введите назначенное имя образца для каждой лунки, содержащей образец или аллельный лэддер. Это позволит идентифицировать позиции лунок каждого образца при сборе и обработке данных.
5. В области «Assay» (Тест-система) выберите подходящую тест-систему для анализа. Если вы выполнили действия, указанные в разделе «Подготовка цикла» (см. стр. 36 ниже), нажмите «Add from Library» (Добавить из библиотеки) и выберите «Investigator 24plex» в качестве протокола работы прибора («Instrument Protocol»). Всем снабженным именами лункам планшета должна быть присвоена тест-система.
6. Повторите это для области «File name conventions» (Правила присвоения имен файлам) и «Results group» (Группа результатов).
7. Выберите лунки, для которых необходимо указать тест-систему. Установите метки в полях рядом с именами для «Assay» (Тест-система), «File name conventions» (Правила присвоения имен файлам) и «Results group» (Группа результатов), чтобы назначить их выбранным лункам.
8. Установите собранный планшет в прибор и закройте дверцу прибора, чтобы повторно инициализировать прибор (если это еще не сделано). Затем нажмите «Link Plate for Run» (Привязать планшет к циклу). На следующем экране введите нужное имя цикла (Run Name) и нажмите «Start Run» (Запустить цикл).

## Параметры анализа/Метод анализа

В Таблица 20 представлены рекомендованные параметры анализа для рабочей таблицы Детектор пиков.

**Таблица 20. Рекомендуемые настройки для генетического анализатора Applied Biosystems 3500/3500xL**

Параметр	Настройки
Peak Detection Algorithm (Алгоритм детекции пиков)	Расширенный
Ranges (Диапазоны)	Анализ: Часть диапазона Начальная точка: Точка остановки: 20 000 Определение размера: Все размеры
Smoothing and Baselining (Сглаживание и установка базовой линии)	Сглаживание: Легкое Окно базовой линии: 51 точка
Size Calling Method (Метод определения длины)	Локальный саузерн-метод
Peak Detection (Детекция пиков)	Пороги амплитуды пиков В:* Y:* G:* R:* P:* O:* Наим. полуширина пика: 51 точка Порядок полинома: 3 Размер окна пиков: 11 точек <sup>†</sup> Пороги наклона: 0.0

\* Порог (предельное значение) амплитуды пиков соответствует наименьшей высоте пика, обрабатываемой программным обеспечением GeneMapper ID-X Software. Такие пороги обычно составляют 50–200 RFU и определяются лабораторией индивидуально.

Рекомендация. Наименьшая высота пиков должна быть в три раза выше фонового шума на базовой линии.

<sup>†</sup> Только настройка размера окна пиков отличается от настройки по умолчанию для анализа HID (установление личности) Applied Biosystems.

# Протокол: анализ

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

Порядок определения точной длины амплифицированных продуктов зависит от типа устройства, условий электрофореза, а также от используемого стандарта длины ДНК. Из-за сложности некоторых локусов определение длины должно осуществляться с использованием равномерно распределенных референсных фрагментов. Стандарт длины ДНК 24plex (ВТО) следует использовать при следующей длине фрагментов: 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 п. о.

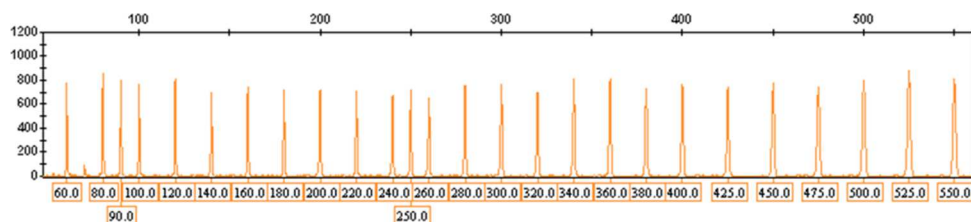


Рис. 4. Электрофореграмма фрагментов стандарта длины ДНК DNA Size Standard 24plex (ВТО), длины указаны в парах оснований.

## Программное обеспечение для анализа

Назначение аллелей должно осуществляться с использованием подходящего программного обеспечения для анализа, например GeneMapper *ID-X Software*, в сочетании с файлами шаблонов Investigator, которые можно загрузить на веб-сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com); см. Таблица 21, стр. 44.

**Таблица 21. Рекомендуемые файлы шаблонов Investigator для GeneMapper ID X**

Тип файлов	Имя файла
Панели	24plex_Panels_x
Наборы бинов	24plex_Bins_x
Статтер	24plex_Stutter_x
Стандарт длины	SST-BTO_60–500bp
Метод анализа	Analysis_HID_3500_200rfu
Настройки построения графика	Plots_6dyes

Панели и наборы бинов должны использоваться всегда, другие файлы шаблонов — дополнительные.

## Контроли

Аллели, перечисленные в Таблица 22, принадлежат к контрольной ДНК Control DNA 9948 (входит в набор Investigator 24plex GO! Kit), а также ДНК других имеющихся в продаже стандартных клеточных линий.

**Таблица 22. Назначение аллелей для набора Investigator 24plex GO! Kit**

Локус	CCR 9948	CCR 9947A	CCR 3657
Амелогенин	X/Y	X/X	X/Y
DYS391	10/10	–	10/10
D1S1656	14/17	18,3/18,3	13/18,3
D2S441	11/12	10/14	14/14
D2S1338	23/23	19/23	18/22
D3S1358	15/17	14/15	16/18
D5S818	11/13	11/11	11/11

См. продолжение таблицы на следующей странице

Продолжение таблицы, начало см. на предыдущей странице

<b>Локус</b>	<b>CCR 9948</b>	<b>CCR 9947A</b>	<b>CCR 3657</b>
D7S820	11/11	10/11	10/11
D8S1179	12/13	13/13	15/16
D10S1248	12/15	13/15	14/16
D12S391	18/24	18/20	18/19
D13S317	11/11	11/11	11/13
D16S539	11/11	11/12	13/13
D18S51	15/18	15/19	12/20
D19S433	13/14	14/15	13/14
D21S11	29/30	30/30	28/29
D22S1045	16/18	11/14	11/17
CSF1PO	10/11	10/12	11/11
FGA	24/26	23/24	18/23
SE33	23,2/26,2	19/29,2	22,2/27,2
TH01	6/9,3	8/9,3	7/9,3
TPOX	8/9	8/8	8/11
vWA	17/17	17/18	14/19

В качестве дополнительной информации для подтверждения в Таблица 22 показаны аллели референсной ДНК, приобретенной в Хранилище клеточных культур Coriell (Coriell Cell Repositories, CCR), а также 2 референсных ДНК, приобретенных в CCR,— см. стандарт в Szibor et al. (2).

---

## Сенсор качества

Набор Investigator 24plex GO! Kit входят два внутренних контроля ПЦР (сенсоры качества Quality Sensor QS1 и QS2), которые позволяют получить важную информацию об эффективности ПЦР-амплификации в целом и о присутствии ингибиторов ПЦР. Внутренние сенсоры качества входят в смесь праймеров и подвергаются амплификации одновременно с полиморфными STR-маркерами. Сенсоры качества помечены ВТР и представляют собой фрагменты длиной 74 п. о. (QS1) и 435 п. о. (QS2).

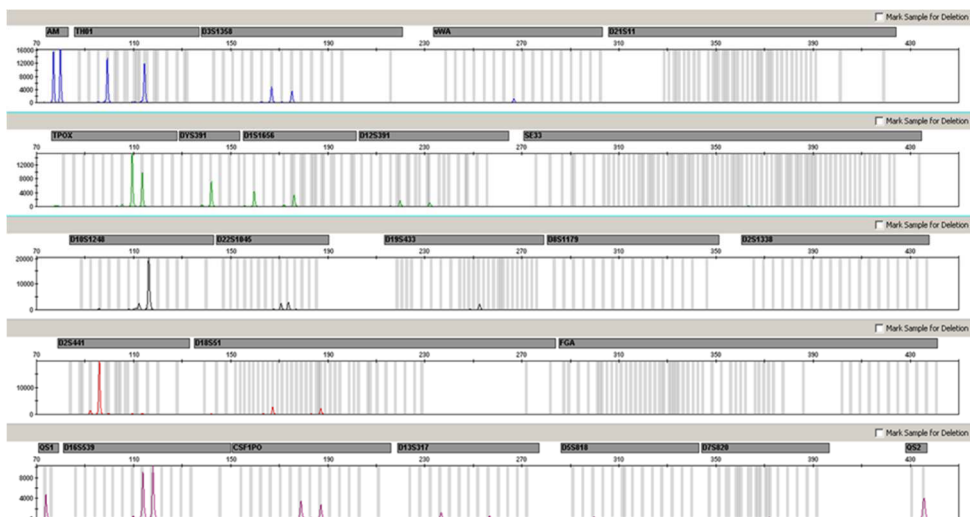
Для решения проблемы сходства последовательностей и возможности неспецифического связывания разработан (с использованием случайного алгоритма) синтетический внутренний контроль, представляющий собой матрицу ДНК. Последовательность этой матрицы отличается от всех известных последовательностей ДНК и, в частности, не имеет сходства с ДНК человека. Поэтому вероятность неспецифического связывания в рамках реакции мультиплексной ПЦР-амплификации очень низка.

В целом успешная амплификация малого сенсора качества (QS1) показывает, что ПЦР была правильно поставлена и проведена, независимо от того, присутствовала ли ДНК в образце. Если при анализе продуктов амплификации сенсор качества не обнаружен, это означает, что пипетирование при постановке ПЦР или сама ПЦР были выполнены неправильно. Это означает, что опыт необходимо повторить, тщательно соблюдая инструкции протокола.

Опыты с целью оценки чувствительности показали, что внутренние контроли не оказывают влияния на качество выполнения ПЦР. При амплификации малых количеств матрицы ДНК были получены схожие результаты для смесей праймеров с сенсорами качества и без них.

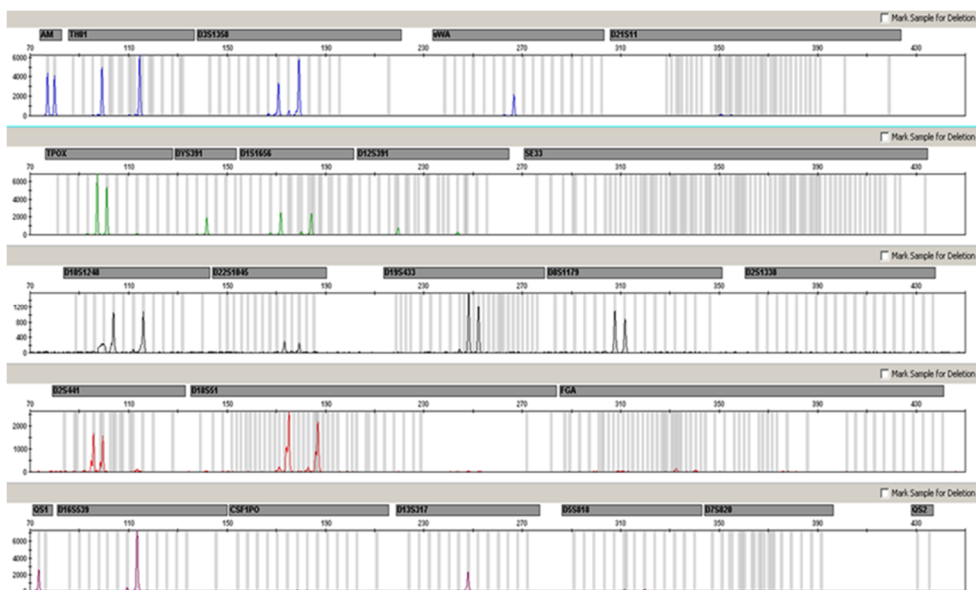
Кроме того, анализ выступающих в качестве внутренних контролей двух фрагментов, QS1 и QS2, а также целевых продуктов амплификации STR-локусов позволяет дифференцированно выявить присутствие ингибиторов или деградацию ДНК в ходе реакции амплификации.

В случае деградации образцов амплификация целевых фрагментов меньшего размера более эффективна, чем амплификация более крупных целевых фрагментов. Однако деградация целевой матрицы не препятствует амплификации фрагментов, выполняющих функцию внутренних контролей, из матрицы внутреннего контроля (рис. 5). Таким образом, присутствие QS1 и QS2 в равных пропорциях, в сочетании с соотношением в пользу целевых продуктов амплификации STR-локусов малого размера говорит о деградации образца.



**Рис. 5. Электрофореграмма STR-анализа в присутствии деградированной ДНК (фрагменты длиной 150 п. о.)** Геномная ДНК разрезалась на фрагменты длиной 150 п. о. с помощью ультразвука. Большие STR-фрагменты амплифицировались с очень низким выходом ПЦР, однако QS1 и QS2 амплифицировались нормально с равной высотой пиков. Маркеры показаны в верхней части электрофореграммы. Сенсоры качества помечены ВТР (панель 5) и представляют собой фрагменты длиной 74 п. о. (QS1) и 435 п. о. (QS2).

Если в образце присутствуют в высоких концентрациях ингибиторы, то амплификация менее эффективна и более крупные фрагменты ДНК амплифицируются хуже, чем более мелкие. Если анализ продуктов амплификации показывает недостаточную амплификацию более крупных целевых STR-последовательностей и более крупного фрагмента, выступающего в качестве сенсора качества (QS2), тогда как сенсор качества меньшего размера (QS1) амплифицирован успешно, это говорит о том, что образец, вероятно, загрязнен ингибиторами. Это означает, что сдвиг соотношения в пользу малого сенсора качества (QS1) свидетельствует о присутствии ингибиторов (рис. 6).



**Рис. 6. Электрофореграмма STR-анализа в присутствии гематина.** Двадцать два STR-маркера, амелогенин и два сенсора качества амплифицировались в присутствии 1000 мкМ гематина, после чего проводился анализ методом капиллярного электрофореза. Амплификация фрагментов с большой молекулярной массой, в том числе STR-маркеров длиной более 250 п. о. и QS2, ингибировалась при высокой концентрации гематина. Маркеры показаны в верхней части электрофореграммы. Сенсоры качества помечены ВРР (панель 5) и представляют собой фрагменты длиной 74 п. о. (QS1) и 435 п. о. (QS2, не виден).



Анализ на предмет присутствия двух сенсоров качества позволяет пользователю дифференцированно выявлять присутствие ингибиторов ПЦР или деградацию криминалистического образца. Это позволяет получать информацию, важную с точки зрения интерпретации данных и планирования следующих этапов работы.

В Таблица 23, стр. 49, кратко представлены возможные профили и их значения.

**Таблица 23. Профили и их значения**

Пики аллелей	QS1	QS2	Интерпретация
Есть	Есть	Есть	Профиль успешной реакции
Нет	Есть	Есть	ДНК отсутствует
Нет	Нет	Нет	ПЦР проведена неудачно
Профиль в виде «горнолыжного склона»	Есть	Спад	Присутствуют ингибиторы
Профиль в виде «горнолыжного склона»	Есть	Есть	Деградация ДНК

**Примечание.** В ходе реакции амплификации с использованием Investigator 24plex GO! Набор реагентов для обоих сенсоров качества ограничен. Это означает, что максимальная высота пиков достигается уже после проведения 25 циклов. Поэтому увеличение количества циклов, например, до 26 или 27 не приведет к увеличению высоты пиков сенсоров качества.

Высота пиков QS1 и QS2 может немного различаться в рамках разных опытов. Небольшой разброс высоты пиков — обычное явление, не обусловленное влиянием ингибиторов. При валидации лаборант должен оценить обычный спектр вариации по отношению к исследуемому типу образцов, а также определить диапазон высоты обычных пиков для обоих QS.

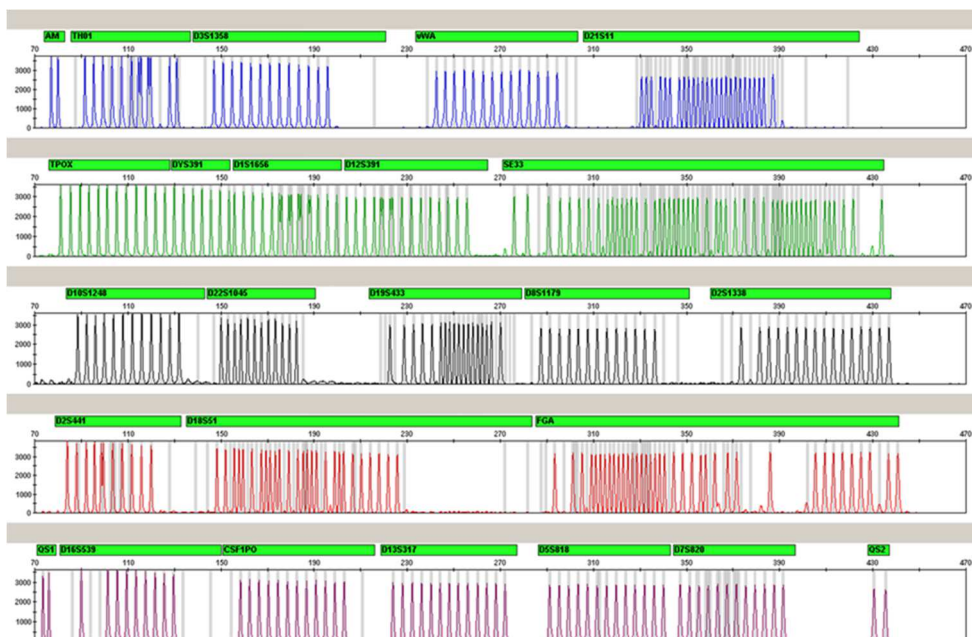
Падение интенсивности сигнала от QS2 до уровня ниже 20 % от интенсивности сигнала от QS1 указывает на ингибирование реакции ПЦР.

## Аллели

В Таблица 24 показаны аллели аллельного лэддера. Все анализы проводились с использованием полимера POP-4 (Таблица 24 рис. 7). Использование разных приборов для анализа, стандартов длины ДНК и полимеров может привести к получению разных значений длины фрагментов. Кроме того, рекомендуется визуальное сопоставление с аллельным лэддером.

### Определение масштаба

- По горизонтали: 70–470 п. о.
- По вертикали: В зависимости от интенсивности сигнала



**Рис. 7. Электрофореграмма аллельного лэддера 24plex, анализ которого выполнен на Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.** Аллельный лэддер содержит по два аллеля на каждый сенсор качества (QS1 и QS2). Это позволяет осуществлять автоматизированную идентификацию пиков QS при анализе образцов.

**Таблица 24. Фрагменты аллельного лэддера, включенные в аллельный лэддер 24plex**

Локус	Флуоресцентная метка	Количества повторов в аллельном лэддере
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, 21
vWA	6-FAM	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
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
SE33	BTG	3, 4.2, 6.3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 17, 18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23.2, 24.2, 25, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 36, 36.2, 37, 38, 39, 42
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

См. продолжение таблицы на следующей странице

Продолжение таблицы, начало см. на предыдущей странице

Локус	Флуоресцентная метка	Количества повторов в аллельном лэддере
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
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

Об известных микровариантах, не содержащихся в аллельном лэддере Investigator 24plex, см. на веб-сайте Национального института стандартов и технологий (National Institute of Standards and Technology, NIST) по адресу: [www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

# Руководство по поиску и устранению неполадок

Научные специалисты технической службы QIAGEN всегда готовы ответить на любые ваши вопросы, касающиеся как информации, содержащейся в настоящем руководстве, в том числе о протоколах, так и методик обработки образцов и проведения анализа (контактную информацию см. на веб-сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Комментарии и рекомендации

---

### Для многих образцов показываются аллели вне диапазона

Слишком большое число циклов ПЦР	Определите оптимальное количество циклов, выполнив анализ репрезентативной партии образцов. Введите повторно образцы, для которых получены результаты вне диапазона, при оптимальных условиях проведения цикла, сократив время введения.
----------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### Для многих образцов получен слабый сигнал либо сигнал отсутствует

Слишком малое число циклов ПЦР	Определите оптимальное количество циклов, выполнив анализ репрезентативной партии образцов.
--------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------

### Несбалансированность профилей, низкая интенсивность сигналов

- |                                                                                              |                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Неправильный объем реакционной смеси Fast Reaction Mix 2.0 или смеси праймеров Primer Mix | Проверьте постановку реакции и повторите амплификацию.                                 |
| б) Мастер-микс не перемешивался вихревым способом перед распределением                       | Тщательно перемешайте мастер-микс вихревым способом и кратковременно центрифугируйте.  |
| в) Размер образца слишком большой                                                            | Не используйте более одного кружка диаметром 1,2 мм, а также кружки большего диаметра. |

### Доминирование пиков сенсоров качества

## Комментарии и рекомендации

Пики QS1 и QS2  
слишком доминируют

В программном обеспечении GeneMapper ID-X Software задайте в области «Display Settings» (Настройки отображения) новую настройку параметра «all-dye range» (диапазон для всех красителей), чтобы увеличить другие пики. Этот диапазон должен лежать между значениями для QS1 и QS2.

Важно! Помимо этого, необходимо изменить настройку в области «Analysis Method Editor» (Редактор метода анализа), раздел «peak detector» (детектор пиков), для определения размера («Ranges» [Диапазоны]; «Sizing» [Определение размера]) следующим образом: 75 -> 450.

### Высота пиков QS1 и/или спад сигнала от QS2 в опытах со стандартами

Уменьшение высоты  
пиков QS1 и QS2

Небольшой разброс высоты пиков — обычное явление, не обусловленное влиянием ингибиторов. При валидации лаборант должен оценить обычный спектр вариации по отношению к исследуемому типу образцов, а также определить диапазон высоты обычных пиков для обоих QS.

Падение интенсивности сигнала от QS2 до уровня ниже 20 % от интенсивности сигнала от QS1 указывает на ингибирование реакции ПЦР.

### Для образцов, взятых из мазков, получен слабый сигнал применительно к высокомолекулярным маркерам

Неполный лизис

Выполните дополнительное лизирование при температуре 95 °C.

### Подготовка образцов

Необходимо увеличить  
интенсивность сигналов  
от образцов

Уменьшите объем стандарта длины ДНК DNA Size Standard 24plex (BTO) до получения высоты пиков около 500 RFU.

Очищайте продукты ПЦР перед началом анализа. Для быстрой и эффективной очистки рекомендуется использовать набор MinElute® PCR Purification Kit (QIAGEN, № по кат. 28004 и 28006).

### Неправильная матричная/спектральная калибровка

При текущей  
матричной/спектральной  
калибровке между  
панелями красителей (B,  
G, Y, R, P, O)  
присутствуют  
артефактные пики  
(«пуллап»).

Имеющуюся матрицу нельзя использовать для анализа. Повторите процедуру формирования матрицы/спектральной калибровки. Обязательно тщательно следуйте надлежащему протоколу для используемого анализатора.

### Многие пики помечаются как пики аллелей вне лэддера (off-ladder, OL) в образцах

## Комментарии и рекомендации

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Стандарт длины ДНК DNA Size Standard 24plex (ВТО) не задан или задан неправильно                                                                                                                                                                                                                       | Щелкните мышью на оранжевой пиктограмме «Size Match Editor» (Редактор сопоставления размеров) на верхней панели инструментов программы GeneMapper ID Software или GeneMapper ID-X Software. Отметьте оранжевые фрагменты всех образцов.<br>Всегда используйте стандарт длины ДНК DNA Size Standard 24plex при работе с ПЦР-наборами для установления личности Investigator Human Identification PCR Kits. |
| б) Интенсивность сигналов слишком высокая. Если высота пиков образцов выходит за пределы диапазона линейного детектирования (>5000 RFU при использовании генетических анализаторов Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer), может возрасти количество статтеров, раздвоенных пиков и артефактов. | Постепенно уменьшите время введения минимум до 1 с, уменьшите количество используемого для анализа продукта ПЦР-амплификации или уменьшите количество ДНК, используемой для ПЦР.                                                                                                                                                                                                                          |
| в) Присутствие пузырьков в выводе капилляра влечет за собой возникновение артефактных пиков («всплесков») на всех цветовых панелях, что, в свою очередь, ведет к ошибкам обозначения аллелей                                                                                                              | Повторите процедуру электрофореза для подтверждения результатов. Проверьте, какое максимальное количество операций введения рекомендовано изготовителем прибора. При необходимости установите новый капиллярный блок.                                                                                                                                                                                     |
| г) Различия в работе капилляров многокапиллярного анализатора в ходе цикла могут приводить к сдвигу при назначении аллелей                                                                                                                                                                                | Для надежного назначения аллелей на многокапиллярных анализаторах необходимо выполнить цикл с несколькими аллельными лэддерами.                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| д) Низкая температура воздуха в помещении или низкая температура буферов CE может приводить к сдвигам с миграцией фрагментов или получению пиков вне лэддера (OL)                                                                                                                                         | Убедитесь, что условия окружающей среды поддерживаются в диапазонах, рекомендованных изготовителем прибора. Необходимо обеспечить доведение буферов до температуры окружающего воздуха. Изготовитель прибора рекомендует предварительно подогревать прибор CE (~30 мин).                                                                                                                                  |

### Неправильное введение/Неверный файл аллельного лэддера

## Комментарии и рекомендации

---

- а) Дополнительный сигнал может быть опознан как пик аллельного лэддера из-за сбоев в ходе электрофореза. При неправильном определении пиков аллельного лэддера этот лэддер нельзя использовать для анализа
- Используйте данные другого введения/другой файл аллельного лэддера и проверьте данные анализа размера, полученные для стандарта длины (в п. о.) применительно к аллельному лэддеру. Всегда используйте стандарт длины ДНК 24plex при работе с ПЦР-наборами Investigator для установления личности.
- б) Один из пиков аллельного лэддера ниже диапазона детектирования пиков (50–200 RFU) для используемого метода анализа и поэтому не определяется
- Аллельный лэддер необходимо загрузить в прибор для анализа в большей концентрации по сравнению с концентрацией образцов, подлежащих анализу. Вместо этого можно проанализировать данные для аллельного лэддера, задав более низкий порог детектирования пиков в программе для анализа.
- в) Один из пиков аллельного лэддера не определяется, так как находится за пределами ожидаемого диапазона размеров (в п. о.), предусмотренного программным обеспечением
- Сравните длину фрагментов (в п. о.) первого аллеля в одном цвете аллельного лэддера с соответствующим значением в области категорий (categories). Затем сравните это значение со значениями для других аллелей.
- г) Точечные аллели не найдены
- Точечные аллели — это аллели, отличающиеся от следующего целочисленного аллеля как минимум на 1 п. о. Проверьте настройки метода анализа. Уменьшите значение параметра «Peak Window Size» (Размер окна пиков) до 11 точек.



---

## Цитируемая литература

1. Bär, W., et al. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* **110**, 175.
2. Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics — the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* **138**, 37.

---

# Приложение А: Интерпретация результатов

После ПЦР-анализа и автоматического назначения аллелей с использованием подходящего программного обеспечения необходимо обеспечить точный и надежный дискриминантный анализ (анализ генотипа по аллелям).

## Общий порядок проведения анализа

1. Проверьте стандарт длины ДНК.
2. Проверьте аллельный лэддер.
3. Проверьте положительный контроль.
4. Проверьте отрицательный контроль.
5. Выполните анализ и интерпретируйте данные для образца.

## Артефактные пики («пуллап»)

Артефактные пики могут возникнуть, если высота пиков находится вне диапазона линейного детектирования (см. «Руководство по поиску и устранению неполадок», стр. 53) или если применена неправильная матрица. Они возникают на позициях определенных пиков в других цветовых каналах и обычно характеризуются более низкой интенсивностью сигнала. Для того чтобы не появлялись артефактные пики, необходимо, чтобы высота пиков не превышала пороговые значения.

## Статтер-пики

Возникновение статтер-пиков обусловлено последовательностью структуры повторов и количеством аллелей. Пики  $n-4$  возникают в результате потери единицы повтора при амплификации тетра nukлеотидных STR-мотивов, что связано с явлениями «проскальзывания» ДНК-полимеразы Taq. Пики  $n-3$  возникают в особенности при амплификации тринуклеотидного STR-мотива D22S1045. Такие пики следует

---

интерпретировать с использованием файлов шаблонов Investigator для программного обеспечения GeneMapper *ID-X Software*.

### Независимое от шаблона добавление нуклеотидов

Из-за активности терминальной трансферазы ДНК-полимераза Taq может вызывать неполное аденилирование 3'-конца амплифицированных фрагментов ДНК. Артефактный пик на одно основание короче ожидаемого (пики  $-1$ ). Все праймеры, входящие в набор Investigator 24plex GO! Kit разработаны таким образом, чтобы уровень таких артефактов был минимальным. Высота артефактных пиков коррелирует с количеством ДНК. Лаборатории должны самостоятельно определять предельные значения для анализа пиков.

### Артефакты

Температура в помещении может повлиять на функциональные характеристики продуктов ПЦР при работе с многокапиллярными приборами, поэтому возможно возникновение «плечевых», или раздвоенных, пиков. При появлении «плечевых», или раздвоенных, пиков рекомендуется повторить введение образца. Убедитесь, что условия окружающей среды поддерживаются в диапазонах, рекомендованных изготовителем прибора. Необходимо обеспечить доведение буферов до температуры окружающего воздуха.

---

## Приложение В: Изменение объемов ПЦР с использованием набора Investigator 24plex GO! Kit

Набор Investigator 24plex GO! Kit (200) предназначен для проведения не менее 200 реакций объемом 20 мкл или 400 реакций объемом 10 мкл.. Следует учитывать, что, хотя нами успешно проведены испытания с использованием объема реакционной смеси, меньшего по сравнению с заявленным здесь, наилучших общих показателей эффективности все же следует ожидать при использовании полных реакционных объемов, рекомендуемых в руководстве пользователя, прилагаемом к набору.

Клетки крови или буккальные клетки на пластинках ФТА или других бумажных пластинках

Рекомендуется использовать буфер для лизирования Investigator STR GO! Punch Buffer для преодоления возможного ингибирования реакции, обусловленного присутствием бумаги. Добавляйте 2 мкл буфера для кружков Investigator STR GO! Punch Buffer независимо от конечного реакционного объема.

Лизаты, полученные из буккальных мазков

Рекомендуется уменьшать объем добавляемого лизата пропорционально уменьшению реакционного объема, т. е. вносить 1 мкл лизата для реакций половинного объема. Внесение больших объемов может приводить к ингибированию ПЦР-амплификации.

**Таблица 25. Подготовка реакций с половинным объемом**

<b>Компонент</b>	<b>Объем на одну реакцию</b>
Реакционная смесь Fast Reaction Mix	3,75 мкл
Смесь праймеров	6,25 мкл
<b>Общий объем*</b>	<b>10 мкл</b>

\* За исключением объемов мазка с лизатом или буфера Investigator STR GO! Punch Buffer.

# Информация для заказа

Продукт	Содержание	№ по каталогу
Investigator 24plex GO! Kit (200)	Смесь праймеров Primer Mix, реакционная смесь Fast Reaction Mix 2.0, включающая ДНК-полимеразу <i>Taq</i> DNA Polymerase, контрольную ДНК Control DNA, аллельный лэддер Allelic Ladder 24plex, а также стандарт длины ДНК DNA size standard 24plex (BTO)	382426
Investigator 24plex GO! Kit (1000)	Смесь праймеров Primer Mix, реакционная смесь Fast Reaction Mix 2.0, включающая ДНК-полимеразу <i>Taq</i> DNA Polymerase, контрольную ДНК Control DNA, аллельный лэддер Allelic Ladder 24plex, а также стандарт длины ДНК DNA size standard 24plex (BTO)	382428
<b>Сопутствующие продукты</b>		
Matrix Standard BT6 (50)	Матричный стандарт для 6-FAM, VTG, VTU, VTR2, VTP и BTO, для Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers	386224
Investigator STR GO! Lysis Buffer (200)	Буфер для лизирования 200 образцов, полученных из мазков	386516
Investigator STR GO! Punch Buffer (1000)	Буфер для кружков — для 1000 образцов эпителиальных клеток на бумажных пластинках	386528
Investigator STR GO! Punch Buffer (200)	Буфер для кружков — для 200 образцов эпителиальных клеток на бумажных пластинках	386526

Продукт	Содержание	№ по каталогу
<b>ПЦР-наборы для установления личности Investigator Human Identification PCR Kits</b>		
Investigator Quantiplex HYres Kit (200)	Реакционная смесь Reaction Mix FQ, смесь праймеров Primer Mix IC YQ, контрольная ДНК Control DNA Z1, буфер для разведения нуклеиновых кислот QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387116
Investigator Quantiplex Kit (200)	Реакционная смесь Reaction Mix FQ, смесь праймеров Primer Mix IC FQ, контрольная ДНК Control DNA Z1, буфер для разведения нуклеиновых кислот QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387016
Investigator 24plex QS Kit (100)*	Смесь праймеров Primer Mix, реакционная смесь Fast Reaction Mix 2.0, включающая ДНК-полимеразу <i>Taq</i> DNA Polymerase, контрольную ДНК Control DNA, аллельный лэддер Allelic Ladder 24plex, стандарт длины ДНК DNA size standard 24plex (BTO) и воду, очищенную от нуклеаз	382415

\* Имеются наборы большего объема, обращайтесь к представителю компании.

Свежую информацию о лицензиях, а также заявления об отказе об ответственности применительно к конкретным продуктам см. в соответствующем руководстве к набору QIAGEN или руководстве пользователя. С руководствами к наборам QIAGEN и руководствами пользователя можно ознакомиться на веб-сайте по адресу **www.qiagen.com**. Их также можно заказать через техническую службу QIAGEN или регионального дистрибьютора.

# История изменения

## История изменения документа

R4 12/2017	Добавлен оптимизированный протокол, а также информация об устройствах для сбора буккального эпителия Bode Buccal DNA Collector (стр. 12, 16, 19–22)
R5 11/2018	Добавлено приложение В
R6 04/2019	Изменен этап 3 и добавлено примечание к таблице 2 в документе «Протокол: ПЦР-амплификация из крови на бумажных пластинках FTA или других бумажных пластинках»; добавлены дополнительные сведения в приложение В с целью сокращения ПЦР-объемов

## Ограниченное лицензионное соглашение для набора Investigator 24plex GOI Kit

Использование настоящего изделия означает согласие покупателя или пользователя изделия со следующими условиями.

1. Изделие можно использовать исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к изделию, и настоящим руководством, причем только с компонентами, которые входят в состав набора. Компания QIAGEN не предоставляет лицензии в рамках своей интеллектуальной собственности на использование или объединение прилагаемых компонентов настоящего набора с какими-либо компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, предоставляемых вместе с продуктом, данным руководством и дополнительных протоколах, доступных по адресу [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Некоторые из таких дополнительных протоколов предоставлены пользователями продукции компании QIAGEN для пользователей продукции компании QIAGEN. Такие протоколы не были всесторонне проверены или оптимизированы компанией QIAGEN. Компания QIAGEN не гарантирует их правильности, а также не гарантирует того, что они не нарушают прав третьих лиц.
2. Кроме официально заявленных лицензий, компания QIAGEN не предоставляет никаких гарантий того, что данный набор и/или его использование не нарушают прав третьих лиц.
3. Данный набор и его компоненты лицензированы для однократного использования и не подлежат повторному использованию, перепродаже или перепродаже.
4. Компания QIAGEN прямо отказывается от всех прочих лицензий, заявленных или подразумеваемых, кроме тех, о которых заявлено официально.
5. Покупатель и пользователь данного набора соглашаются не совершать и не допускать совершения другими лицами каких-либо действий, которые могут привести к любым действиям, запрещенным выше, или способствовать им. Компания QIAGEN может требовать исполнения запретов, предусмотренных настоящим ограниченным лицензионным соглашением, в судебном порядке в любом суде и получать возмещения всех понесенных ею следственных и судебных издержек, включая стоимость юридических услуг, по любому иску, направленному на исполнение настоящего ограниченного лицензионного соглашения или любого из своих прав на интеллектуальную собственность, связанных с набором и/или его компонентами.

Актуальные условия лицензии см. на сайте по адресу [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Товарные знаки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Investigator®, MinElute®, Rotor-Gene® (группа компаний QIAGEN); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, 6-FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Genotyper®, Hi-Di™, POP-4™ (компания Thermo Fisher Scientific или ее филиалы); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Bode Buccal DNA Collector™ (Bode Cllmark Forensics); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); GenBank® (Министерство здравоохранения и социального обеспечения США), FTA®, EasiCollect®, Whatman® (группа компаний Whatman). Используемые в данном документе зарегистрированные наименования, товарные знаки и т. п., в том числе не отмеченные специально как таковые, не должны рассматриваться как не защищенные законодательством.

HB-1913-005 © 2015–18 QIAGEN, все права защищены.