

Ханчжоу Цзюшэн Биотехнологис Ко., Лтд
Юр. Адрес: Провинция Чжэцзян, город Ханчжоу, район Биньцзян,
ул. Биньянь д. 688, 4-й этаж 2, блок D, офис 326, Китай
ИНН 91330108МА2J1CGM8J
Тел: 0571-87705662, E-mail: jiusheng0911@126.com



Руководство пользователя

Набор для идентификации личности Express G28(WT)

Применимо к

Набору для идентификации личности Express G28(WT)

Версия 1.1

Дата: 2024-02-22

Номер документа: B07403.1E

Оглавление

1. Описание	2
2. Условия хранения.....	6
3. Компоненты комплекта.....	6
4. Перед началом работы	8
5. Проведение ПЦР.....	9
6. Цикл ПЦР и количество циклов.....	10
7. Матрица красителя и спектральная калибровка.....	11
8. Обнаружение продуктов ПЦР	15
9. Анализ данных с использованием программного обеспечения GeneMapper® ID-X версии 1.4.....	27
10. Генотипирование Смесь аллельных ладдеров.....	34
11. Генотипирование Положительного контроля 9948.....	35
12. Устранение неполадок	36

1. Описание

Короткие tandemные повторы (STR) – это короткие последовательности ДНК в геноме человека, обычно длиной 2-6 нуклеотидных пар (н.п.), которые повторяются множество раз по принципу «голова-хвост». Эти повторы равномерно распределены по всему геному человека и служат богатым источником высокополиморфных маркеров, которые можно обнаружить с помощью полимеразной цепной реакции. Аллели локусов STR дифференцируют по количеству копий содержащихся в амплифицированной области повторяющихся последовательностей, и различают по длине соответствующих им фрагментов. Широкое распространение STR и разнообразное количество повторов позволяют считать их идеальными генетическими маркерами для индивидуальной идентификации и тестирования на отцовство с помощью комбинации полимеразной цепной реакции (ПЦР) и капиллярного электрофореза.

Набор для идентификации личности Express G28(WT) предназначен для проведения мультиплексного анализа по 29 локусам в целях идентификации ДНК человека, включая судебно-медицинский анализ, тестирование родственных отношений и использование в научных исследованиях. Система с 6 красителями позволяет одновременно амплифицировать 25 аутосомных локусов STR, один локус Y-STR (DYS391), один полиморфный маркер вставки/делеции на Y-хромосоме (Y-indel), один SR Y и определяющий пол маркер (таблица 1). Комплект удовлетворяет рекомендациям как CODIS, так и ESS. Комплект, разработанный на основе высокоэффективного мастер-микса, высокоустойчив к различным ингибиторам и обеспечивает быструю амплификацию.

В таблице 1 показаны амплифицированные локусы, их расположение в хромосоме, последовательность повторов, диапазон маркеров и соответствующие флуоресцентные красители. В таблице также указан генотип Положительного контроля 9948.

Таблица 1. Локусы и аллели Набор для идентификации личности Express G28(WT)

Обозначение локуса	Маркирован красителем	Диапазон маркеров	Расположение в хромосоме	Повторная последовательность	Генотип Положительный контроль 9948
D3S1358	Синий	102-155	3p21.31	TCTA Комплекс	15/17
TH01	Синий	157-199	11p15.5	AATG	6/9.3
D21S11	Синий	206-273	21q21.1	TCTA Комплекс	29/30
D18S51	Синий	282-367	18q21.33	AGAA	15/18
Penta E	Синий	373-495	15q26.2	AAAGA	11
Y-indel	Зеленый	98.5-106	Yq11.221	TTCTC	2
DYS391	Зеленый	113-160	Yq11.21	TCTA	10
D12S391	Зеленый	160.5-223	12p12	AGAT/AGAC Комплекс	18/24
D6S1043	Зеленый	233-305	6q15	AGAT	12
D2S1338	Зеленый	309-390	2q35	TGCC/TTCC	23

D1S1656	Зеленый	391-446	1q42	TAGA Комплекс	14/17
D4S2366	Зеленый	452-496	4p16.1	GATA	9/14
D5S818	Желтый	120-168	5q23.2	AGAT	11/13
D13S317	Желтый	172-219	13q31.1	TATC	11
D7S820	Желтый	220-261	7q21.11	GATA	11
D19S433	Желтый	268-330	19q12	AAGG Комплекс	13/14
CSF1PO	Желтый	334-381	5q33.1	AGAT	10/11
Penta D	Желтый	394-483	21q22.3	AAAGA	8/12
D2S441	Красный	83-122	2p14	TCTA	11/12
vWA	Красный	124-192	12p13.31	TCTA Комплекс	17
D8S1179	Красный	198-259	8q24.13	TCTA Комплекс	12/13
TPOX	Красный	264-312	2p25.3	AATG	8/9
FGA	Красный	318-462	4q28	TTTC Комплекс	24/26
AMEL	Пурпурный	103 - 112	Xp22.1 - 22.3	NA	X/Y
SRY	Пурпурный	115 -121	Y	NA	SRY
D16S539	Пурпурный	123-171	16q24.1	GATA	11
D22S1045	Пурпурный	173-215	22q12.3	ATT	16/18
SE33	Пурпурный	236-371	6q14	AAAG	23.2/26.2
D10S1248	Пурпурный	384-436	10q26.3	GGAA	12/15

ПРИМЕЧАНИЕ: при использовании маркеров длины фрагментов ДНК, такого как стандарт длины Размер-500, расчетные длины всех компонентов лабдера могут отличаться от указанных в списке. Это вызвано различиями миграции различных последовательностей в компонентах аллельного лабдера и стандарта длины. Метка красителя и линкер также влияют на миграцию аллелей.

Набор для идентификации личности Express G28(WT) основан на анализаторах Applied Biosystems® 3500 и 3500xL Genetic, Генетических анализаторов серии G, с возможностью использования наборов на картридже 36 см и полимере POP-4™. Обратите внимание, что амплификацию и обнаружение может потребоваться проводить на разных приборах. Поэтому мы рекомендуем оптимизировать протоколы, такие как количество матричной ДНК, количество циклов и условия инъекции, к вашим лабораторным приборам.

2. Условия хранения

Содержание	Условия хранения
Смесь праймеров Express G28(WT) Мастер-микс Express G28(WT)	При -25~-15°C при получении. При 2~8°C после первого использования в течение 6 месяцев или до истечения срока годности (в зависимости от того, что наступит раньше). Защищайте набор праймеров от воздействия света.
Положительный контроль 9948	При -25~-15°C при получении. При 2~8°C после первого использования до истечения срока годности.
Вода без нуклеаз	При -25~-15°C при получении. При 2~8°C после первого использования.
Размер-500 Смесь аллельных ладдеров Express G28(WT)	При -25~-15°C при получении. При 2~8°C после первого использования в течение 6 месяцев или до истечения срока годности. В защищенном от света месте
Стандарт матрицы 6-спектр	При -25~-15°C при получении. При 2~8°C после первого использования в течение 6 месяцев. Хранить в защищенном от света месте.

3. Компоненты комплекта

В каждом комплекте содержится достаточное количество реагентов для 200 реакций (25 мкл на реакцию) Express G28(WT) реагенты для амплификации и Express G28(WT) реагенты для пост-амплификации упакованы в отдельные коробки. Реагент для спектральной калибровки продается отдельно.

3.1. Реагенты для амплификации Express G28(WT)

Компонент	Описание	25мкл*200 реакций
Мастер-микс Express G28(WT)	Содержит MgCl ₂ , фермент и др.	1500мкл*1шт
Смесь праймеров Express G28(WT)	Содержит смесь праймеров, dNTP и т.д.	1000мкл*1шт
Положительный контроль 9948	Человеческая ДНК	25мкл*1шт
Вода без нуклеаз	-	1000мкл*3шт

3.2. Реагенты для пост-амплификации Express G28(WT)

Компонент	Описание	25мкл*200 реакций
Смесь аллельных ладдеров Express G28(WT)	Смесь аллельного ладдера	100мкл*1шт
Размер-500	Стандарт длины ДНК	250мкл*1шт

3.3. Реагент для спектральной калибровки (продается отдельно)

Компонент	Описание	Норма
Стандарт матрицы 6-спектр	Стандарт спектральной калибровки	30 мкл * 1 шт

3.4. Обзор смеси аллельного ладдера

Смесь аллельных ладдеров Express G28(WT) представляет собой комбинацию всех аллельных ладдеров, используемых для калибровки отклонения скорости миграции продуктов ПЦР при капиллярном электрофорезе. Калибровка обеспечивает точное генотипирование чисел повторов STR. Профиль генотипирования показан на странице 34.

3.5. Обзор стандарта длины ДНК

Размер-500 — это стандарт длины ДНК для расчета длины фрагментов ДНК для ПЦР. Он содержит 19 помеченных красителем фрагментов ДНК со следующей длиной нуклеотидных пар: 75, 87, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 (рис. 1).

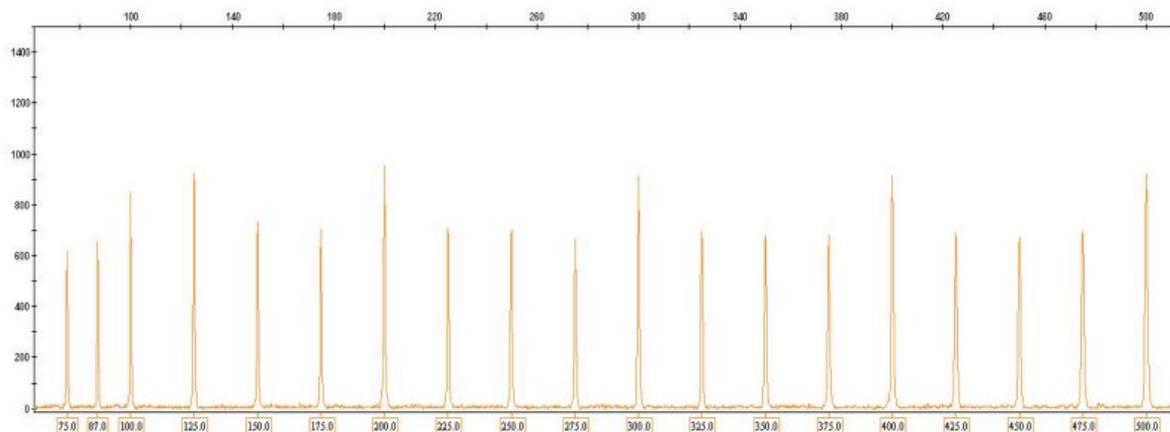


Рисунок 1. Стандарт длины ДНК

4. Перед началом работы

4.1. Меры предосторожности

На эффективность ПЦР могут повлиять качество очищенной ДНК или образцов прямой амплификации, небольшие изменения в буферах, ионной силе, концентрации праймеров, объеме реакции, выборе термоциклера и условиях термоциклирования. Предлагаем строго придерживаться рекомендуемых процедур амплификации и детекции флуоресценции. При внесении каких-либо изменений в рекомендуемые протоколы нужно провести дополнительные исследования и валидацию.

STR-анализ на основе ПЦР чувствителен к загрязнению очень малыми количествами ДНК человека. Для недопущения перекрестной контаминации при приготовлении матричной ДНК, работе с парами праймеров, сборке реакций амплификации и анализе продуктов амплификации следует соблюдать крайнюю осторожность.

Некоторые используемые при анализе продуктов STR реагенты могут быть опасны, и с ними следует обращаться соответствующим образом. Формамид обладает раздражающим и тератогенным действием; избегайте его вдыхания и контакта с кожей. При обращении с этим

веществом прочтите предупреждающую этикетку и примите соответствующие меры предосторожности. При работе с формамидом всегда надевайте перчатки и защитные очки.

4.2. Спектральная калибровка

Правильная спектральная калибровка имеет решающее значение для правильной оценки многоцветных систем с помощью анализаторов Applied Biosystems® 3500, 3500xL Genetic, Генетических анализаторов серии G. Для каждого прибора должна быть сгенерирована отдельная матрица.

5. Проведение ПЦР

5.1. Подготовка реакций

Рассчитайте объем каждого компонента, необходимого для приготовления реакций, используя таблицу ниже.

Компонент		Реакционная система объемом 25 мкл
Мастер-микс Express G28(WT)		7,5 мкл
Смесь праймеров Express G28(WT)		5 мкл
Образец ДНК	Матрица ДНК (0,5~20 нг/мкл)	10 мкл
	Положительный контроль 9948	2~4 мкл
Вода без нуклеаз		Добавьте до 25 мкл

Рекомендуемые процедуры:

1. Получение образцов крови

1) Добавьте в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл 400 мкл раствора для обработки образца Sample Processing Solution (буккальный мазок).

2) Добавьте 20 мкл крови, встряхните и хорошо перемешайте, выдержите при температуре 90°C в течение 10 минут, и перед использованием храните при комнатной температуре.

Возьмите в реакционную систему для амплификации 10 мкл образца.

2. Образец буккального мазка

1) Тампоном возьмите соскоб с внутренней стороны слизистой щеки с обеих сторон, не менее чем трехкратно с каждой стороны.

2) Добавьте в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл 800 мкл раствора для обработки образца (буккальный мазок).

3) Поместите собранный буккальный мазок в центрифужную пробирку, хорошо встряхните и перемешайте, инкубируйте при температуре 90°C в течение 10 минут, и перед использованием храните при комнатной температуре.

4) Возьмите в реакционную систему для амплификации 10 мкл образца.

5.2. Контроль качества ПЦР-амплификации

5.2.1. Образцы должны быть амплифицированы с положительным и отрицательным контролем. Амплификацию следует проводить многократно, чтобы уменьшить ошибку выборки.

5.2.2. Не добавляйте матричную ДНК более чем на 60% от общего объема реакции. На эффективность и качество ПЦР влияют РН, связанный с Трис-НСI, эффективная концентрация Mg^{2+} , связанная с хелатированием ЭДТА, и другие ингибиторы ПЦР, концентрация которых зависит от качества матрицы ДНК и метода экстракции.

5.2.3. Избыточное количество матричной ДНК приведет к несбалансированной амплификации аллелей и появлению неспецифических пиков, а недостаточное количество матричной ДНК приведет к потере аллелей или неэффективной амплификации.

6. Цикл ПЦР и количество циклов

6.1. ПЦР-циклер

ПЦР-циклер, используемый для набора: GeneAmp PCR System 9700 или другой.

Существуют определенные различия между различными марками термоциклеров. Для достижения лучших результатов необходима корректировка. Предлагаемая скорость нарастания температуры в термоциклере составляет менее 3°C/сек.

6.2. Количество циклов

Для набора рекомендуются следующие процедуры ПЦР:

Начальный этап инкубации	2 цикла		23~32 циклов (для всех типов образцов)		Конечная элонгация	Конечная выдержка
	Денатурация	Элонгация	Денатурация	Элонгация		
95°C	94°C	63°C	94°C	60°C	60°C	4°C
2 мин.	10 сек.	1 мин.	10 сек.	1 мин.	5 мин.	До 24 ч

ВАЖНО: При первом использовании Набора для идентификации личности Express G28(WT) проведите эксперимент на чувствительность, чтобы определить подходящее количество циклов. Этот эксперимент учитывает различия от прибора к прибору и от образца к образцу. Если вы обрабатываете несколько комбинаций типов образцов и субстратов (например, очищенную ДНК, обработанные раствором для обработки образцов *Sample processing solution* (буккальный мазок) образцы ДНК, карточку слюны *Saliva Card* и буккальные образцы в мазках), для каждого типа образцов и субстрата проведите отдельные эксперименты на чувствительность.

6.3. Хранение продукта ПЦР

Продукты ПЦР стабильны при температуре 2~8°C в темноте в течение двух дней. Для длительного хранения продукты ПЦР необходимо хранить при температуре -25~-15°C.

7. Матрица красителя и спектральная калибровка

Спектральная калибровка с использованием матрицы красителя необходима для анализа данных. Следуйте инструкциям по калибровке матрицы красителя.

7.1. Приготовление матричной стандартной смеси

Решающее значение для оценки многоцветных систем с ABI Applied Biosystems® 3500 и анализаторами 3500xL Genetic и Генетических анализаторов серии G имеет правильная

спектральная калибровка. Спектральную калибровку генерируют для каждого прибора отдельно. После капитального техобслуживания системы, такого как замена лазера, калибровка или замена ПЗС-камеры или изменение типа полимера или картриджа с капиллярами, следует выполнить новую спектральную калибровку. Также рекомендуем создавать новый файл спектральной калибровки красителя после перемещения прибора в новое местоположение. В некоторых случаях при обновлении программного обеспечения может потребоваться провести новую спектральную калибровку. Частоту спектральной калибровки красителей каждая лаборатория определяет самостоятельно.

Стандарт матрицы 6-спектр требуется для спектральной калибровки анализаторов Applied Biosystems® 3500, 3500xL Genetic, Генетических анализаторов серии G.

Чувствительность обнаружения каждого красителя в разных приборах различается. Указанное ниже соотношение оптимизировано для анализаторов Applied Biosystems® 3500, 3500xL Genetic, Генетических анализаторов серии G.

7.1.1. Разморозьте матричную стандартную смесь и взболтайте ее на вортексе 5–10 секунд.

7.1.2. Приготовьте матричную стандартную смесь в следующем соотношении, и взболтайте ее на вортексе 5–10 секунд до полного перемешивания.

Для 8 капилляров		Для 24 капилляров	
Компонент	Объем (мкл)	Компонент	Объем (мкл)
Hi-Di™ Формаид	100	Hi-Di™ Формаид	250,0
Стандарт матрицы 6-спектр	4,0	Стандарт матрицы 6-спектр	10,0

7.1.3. Добавление образца: в лунки 96-луночного планшета добавьте 10 мкл матричной стандартной смеси, ненадолго переверните, затем загрузите планшет в генетический анализатор.

7.2. Спектральная калибровка (для 3500/3500xL)

7.2.1. Откройте программное обеспечение для сбора данных 3500 Data Collection Software. Откроется экран панели мониторинга Dashboard. Чтобы убедиться, что вы просматриваете наиболее свежую информацию, нажмите кнопку Refresh (Обновить). Убедитесь, что информация о расходных материалах Consumables Information и уведомления о техническом обслуживании Maintenance Notifications приемлемы.

Установите температуру печи на 60°C и выберите “Start Pre-Heat” (“Начать предварительный разогрев”).

7.2.2. Отредактируйте планшет с образцом

Запустите программу сбора данных 3500/3500xL Data Collection; нажмите “Library” (“Библиотека”); выберите “Dye Sets” (“Наборы красителей”); создайте новый набор красителей с именем “GTZ-J6”; в качестве шаблона для набора красителей выберите “J6 Template” (“Шаблон J6”); измените значение верхнего предела номера условия матрицы Matrix Condition Number Upper Limit на 20, нажмите “Save” (“Сохранить”), см. рис. 2.

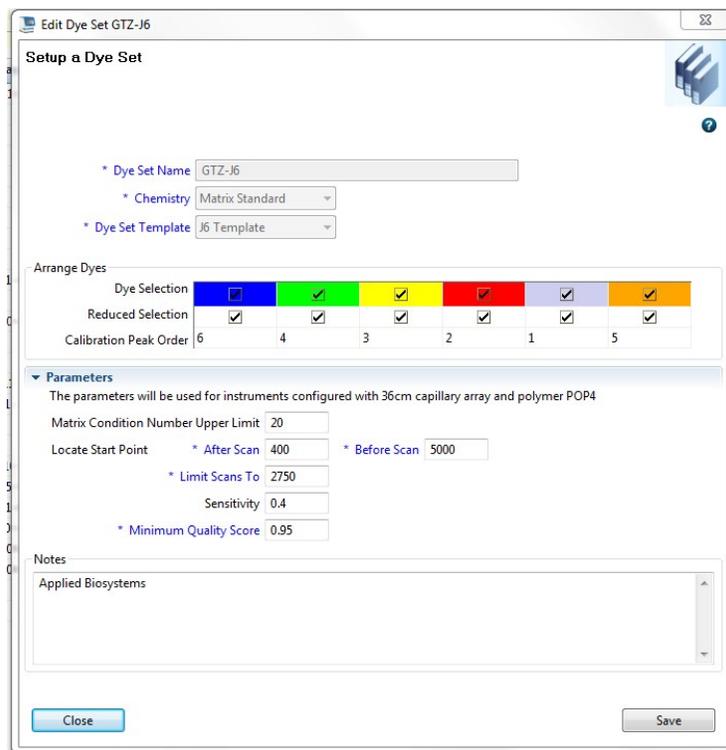


Рисунок 2. Окно создания нового набора красителей Create New Dye Set.

7.2.3. Капиллярный электрофорез

Нажмите “Maintain Instrument” (“Обслуживание прибора”); выберите “Spectral” (“Спектральный”). Выберите набор красителей, созданный в разделе 8.3.2; поместите планшет в генетический анализатор; нажмите “Start Run” (“Начать прогон”), см. рис. 3.

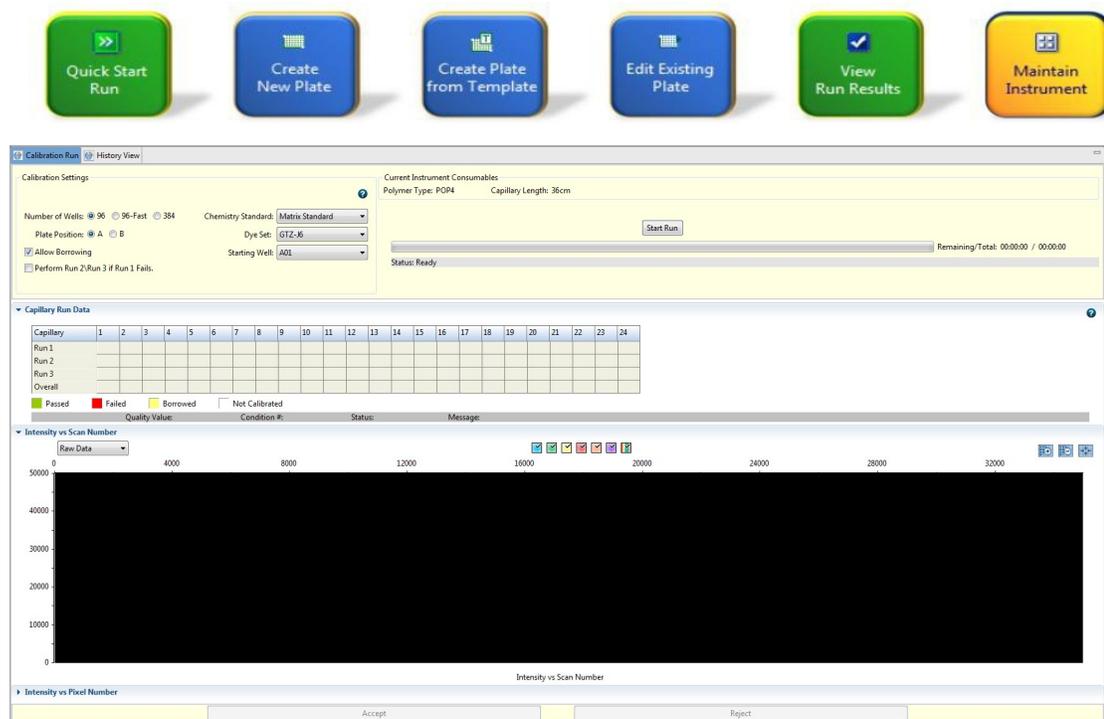


Рисунок 3. Спектральный анализ на генетическом анализаторе Applied Biosystems® 3500.

7.2.4. Проверьте и примите результат

Когда после электрофореза отобразятся пройденные каналы, выберите “Ассерт” (“Принять”). Репрезентативные данные приведены на рисунке 4.

Примечание: оптимальную спектральную калибровку обеспечивает использование свежего полимера и нового картриджа с капиллярами.

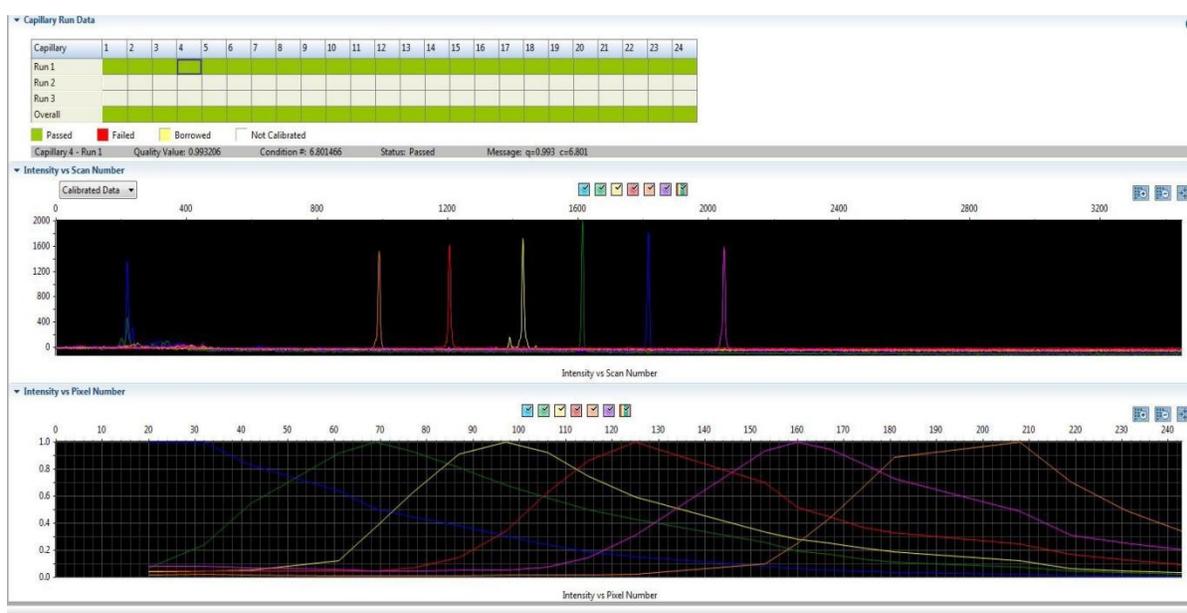


Рисунок 4. Репрезентативные данные для Стандарта матрицы 6-спектр на анализаторе Applied Biosystems® 3500xL Genetic с использованием полимера POP-4™ и программного обеспечения для сбора данных версии 2.0.

8. Обнаружение продуктов ПЦР

8.1. Подготовка образца

8.1.1. Рассчитайте объем формамида Ni-Di™ и стандарт длины ДНК, необходимый для приготовления смеси для загрузки образца.

Реактив	На реакционный объем
Формаид Hi-Di™	8,75 мкл
Размер-500	0,25 мкл

Примечание:

(1) Объем в таблице приведен на основании одной реакции. При приготовлении стандартной смеси SIZE для n реакций рекомендуется увеличить объем стандартной смеси SIZE на $n+1$ (или на 10%), чтобы обеспечить для каждой реакции достаточное количество реагента.

(2) Решающее значение имеет качество формамида (проводимость < 100 мкС/см). Разлейте формамид в аликвоты и храните при температуре -20°C . Многократное замораживание-оттаивание или длительное хранение при температуре 4°C приведет к разложению формамида. Формамид (проводимость > 100 мкС/см) содержит ионы, которые могут конкурировать с фрагментами ДНК за избирательную кинетическую инъекцию, что приводит к снижению чувствительности.

8.1.2. В каждую лунку 96-луночного планшета добавьте по 9 мкл смеси формамида Hi-Di™ и стандарта Размер-500, затем добавьте 1 мкл продукта ПЦР или аллельного ладдера. Закройте реакционный планшет соответствующими перегородками, затем недолго взболтайте на вортексе и центрифугируйте планшет, чтобы убедиться, что содержимое каждой лунки перемешано и собралось на дне.

Примечание: Пределы обнаружения для приборов варьируются. Следовательно, может потребоваться увеличить или уменьшить время впрыска или количество продукта, смешанного с загрузочной смесью. Чтобы изменить время впрыска или напряжение впрыска в модуле прогона, выберите в меню библиотеки Library программного обеспечения для сбора данных “Instrument Protocol” (“Протокол прибора”). Если высота пика выше желаемой, используйте меньшие ДНК-матрицы в реакциях амплификации или уменьшите количество циклов в программе амплификации для достижения желаемой интенсивности сигнала.

8.1.3. Денатурируйте при 95°C в течение 3 минут, быстро охладите на льду в течение 3 минут (или используйте программу ПЦР 3 мин при 95°C → 3 мин при 4°C). Образцы готовы к электрофорезу.

Примечание: этап денатурации обеспечивает устранение вторичных структур продуктов ПЦР, хотя большинство продуктов ПЦР также можно обнаружить без выполнения этого этапа.

8.2. Этапы обнаружения для анализатора 3500/3500xL Genetic

Чтобы запустить 3500 Data Collection, нажмите “Instrument Protocols” (“Протоколы прибора”) и создайте файл протокола Protocol file, а затем “Save” (“Сохранить”) отредактированный GTZJ6 из Dye Set (Набор красителей).

Подготовка прибора

График технического обслуживания прибора и инструкции по установке картриджа с капиллярами, буферов и полимерного футляра и выполнению пространственной калибровки приведены в руководстве пользователя Analyzer User Guide для анализатора Applied Biosystems® 3500/3500xL Genetic.

Образцы можно проанализировать, как описано в руководстве пользователя Applied Biosystems® 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide.

8.2.1. Откройте программное обеспечение для сбора данных 3500 Data Collection Software, чтобы запустить панель мониторинга Dashboard (рис. 5). Убедитесь, что информация о расходных материалах Consumables Information и уведомления о техническом обслуживании Maintenance Notifications приемлемы. Установите температуру печи на 60 °C, затем выберите “Start Pre-Heat” (“Начать предварительный нагрев”), чтобы разогреть печь.

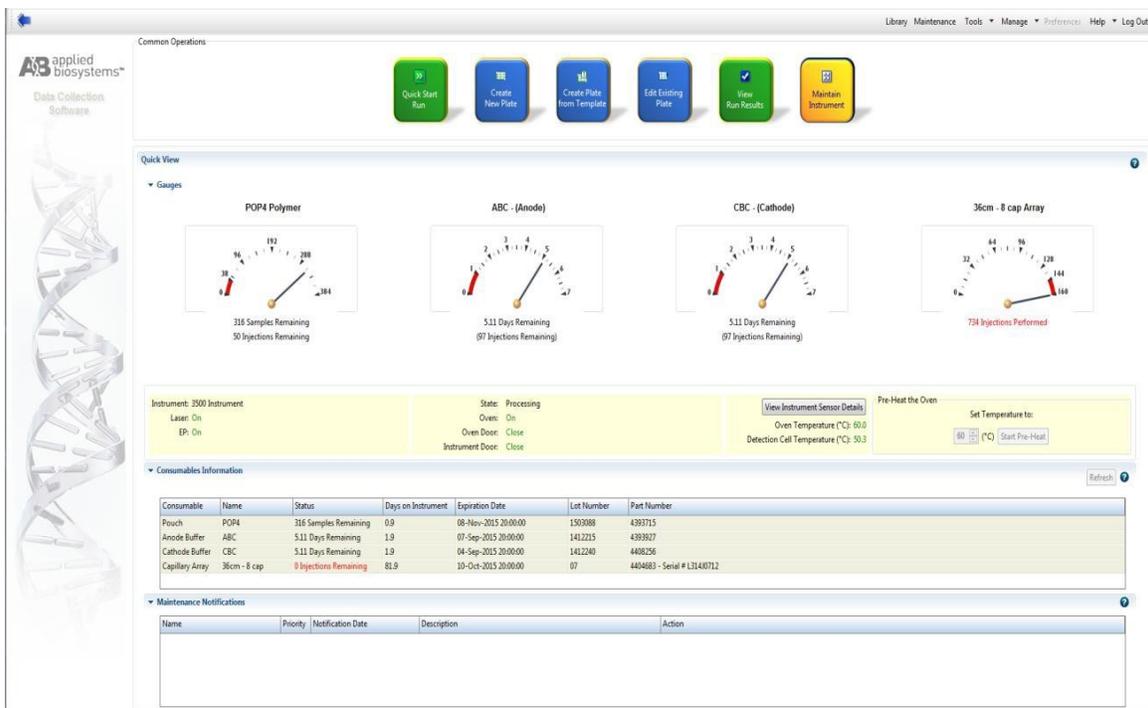


Рисунок 5. Панель мониторинга Dashboard.

8.2.2. Чтобы создать новый протокол прибора Instrument Protocol, перейдите в библиотеку Library, выберите “Instrument Protocol” (“Протокол прибора”), затем выберите “Create” (“Создать”).

В качестве альтернативы можно использовать ранее созданный протокол прибора Instrument Protocol.

На рисунке 6 показаны настройки для анализов, используемых Набор для идентификации личности Express G28(WT) в генетическом анализаторе Applied Biosystems® 3500, для типа применения, набора красителей, длины капилляра, полимера, модуля прогона и соответствующей информации о протоколе. По сравнению с настройками по умолчанию изменяется только набор красителей Dye Set.

Примечание: для анализатора Applied Biosystems® 3500xL Genetic время впрыска составляет 24 секунды (см. рис. 7).

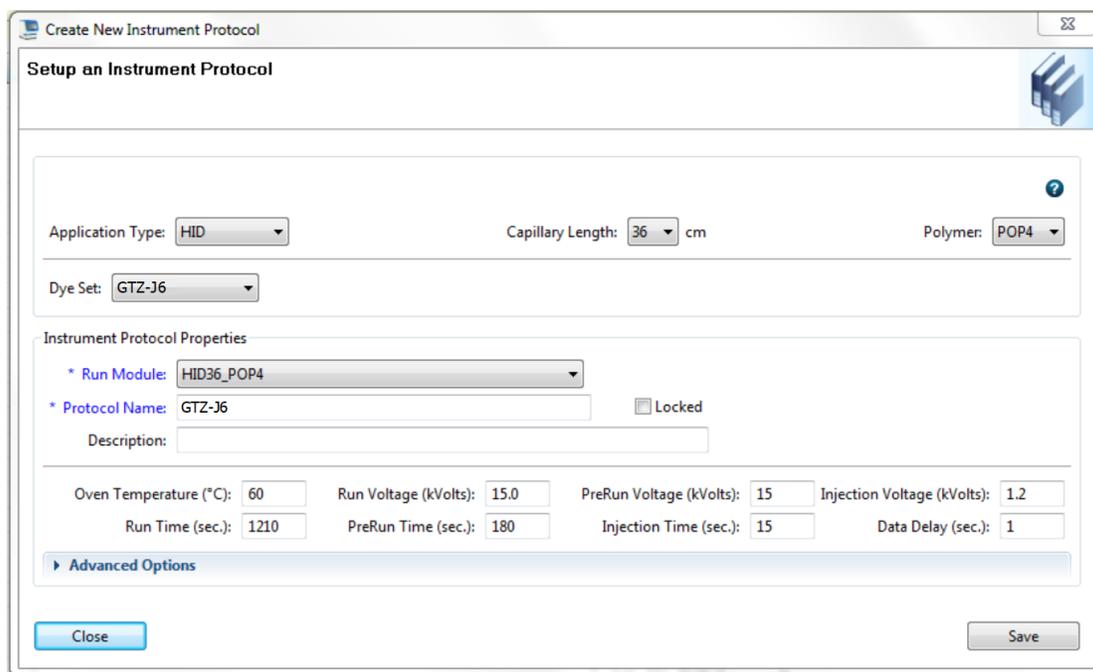


Рисунок 6. Окно создания нового протокола прибора Create New Instrument Protocol для генетического анализатора Genetic Analyzer Applied Biosystems® 3500.

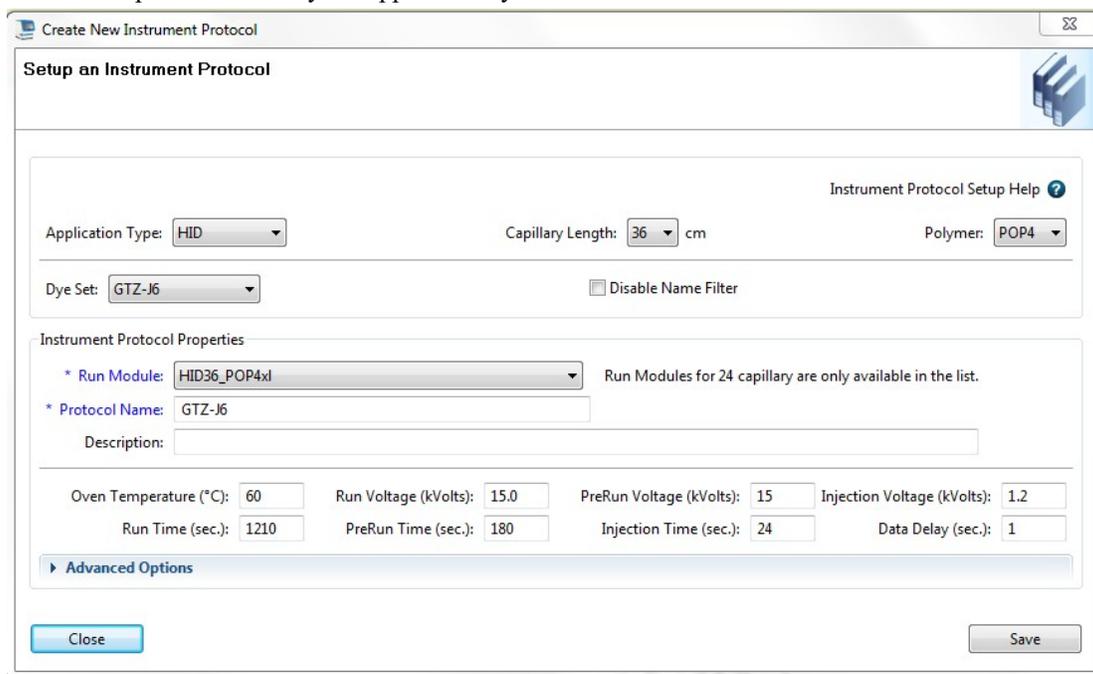


Рисунок 7. Окно создания нового протокола прибора Create New Instrument Protocol для анализатора Applied Biosystems® 3500xL Genetic.

При создании протокола работы прибора обязательно выберите тот же набор красителей, что и использованный для выполнения спектральной калибровки Стандарт матрицы 6-спектр. Рекомендуем использовать условия впрыска по умолчанию. Однако мы настоятельно рекомендуем оптимизировать и проверить в вашей лаборатории время прогона и другие настройки прибора.

Примечание: более подробную информацию см. в руководстве пользователя анализатора Applied Biosystems® 3500/ 3500xL Genetic.

8.2.3. Чтобы создать новый стандарт длины Size Standard для протокола контроля качества QC Protocol, перейдите в библиотеку Library. Выберите “Size Standards” (“Стандарты длины”), а затем выберите “Create” (“Создать”). В качестве альтернативы можно использовать ранее созданный стандарт длины Size Standard. Присвойте стандарту длины значение “500” или другие названия. Выберите в качестве цвета красителя Dye Color значение “Orange” (“Оранжевый”). Фрагменты стандартной длины: 75, 87, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 н.п. См. рис. 8.

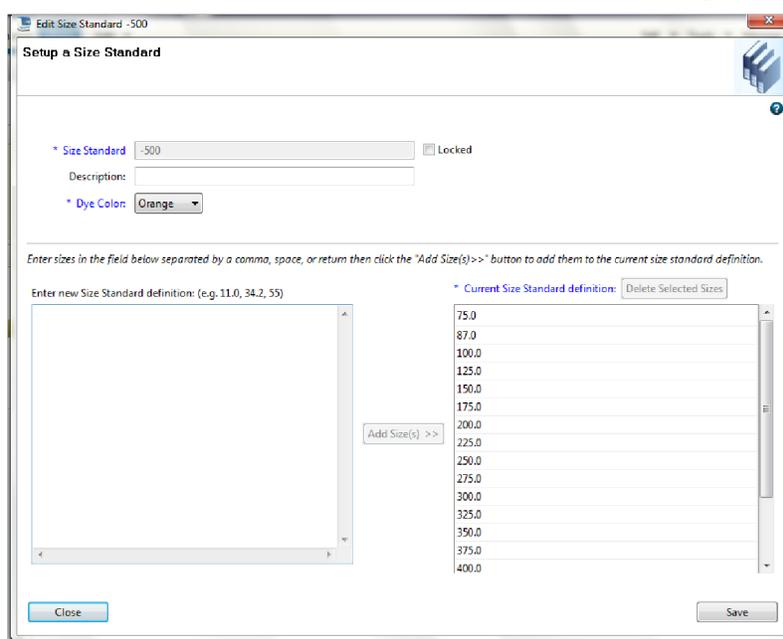


Рисунок 8. Окно создания нового стандарта длины Create New Size Standard.

8.2.4. Чтобы создать новый протокол контроля качества QC Protocol, перейдите в библиотеку Library. Выберите “QC Protocols” (“Протоколы контроля качества”), затем выберите “Create” (“Создать”).

В качестве альтернативы можно использовать ранее созданный протокол контроля качества QC Protocol.

Назначьте протоколу описательное имя. Выберите стандарт длины, созданный на шаге 8.2.3. Протокол контроля качества QC Protocol следует настраивать на основе внутренних проверенных условий для Набор для идентификации личности Express G28(WT) на анализаторах Applied Biosystems® 3500 или 3500xL Genetic. На рисунке 9 показан один из вариантов настройки.

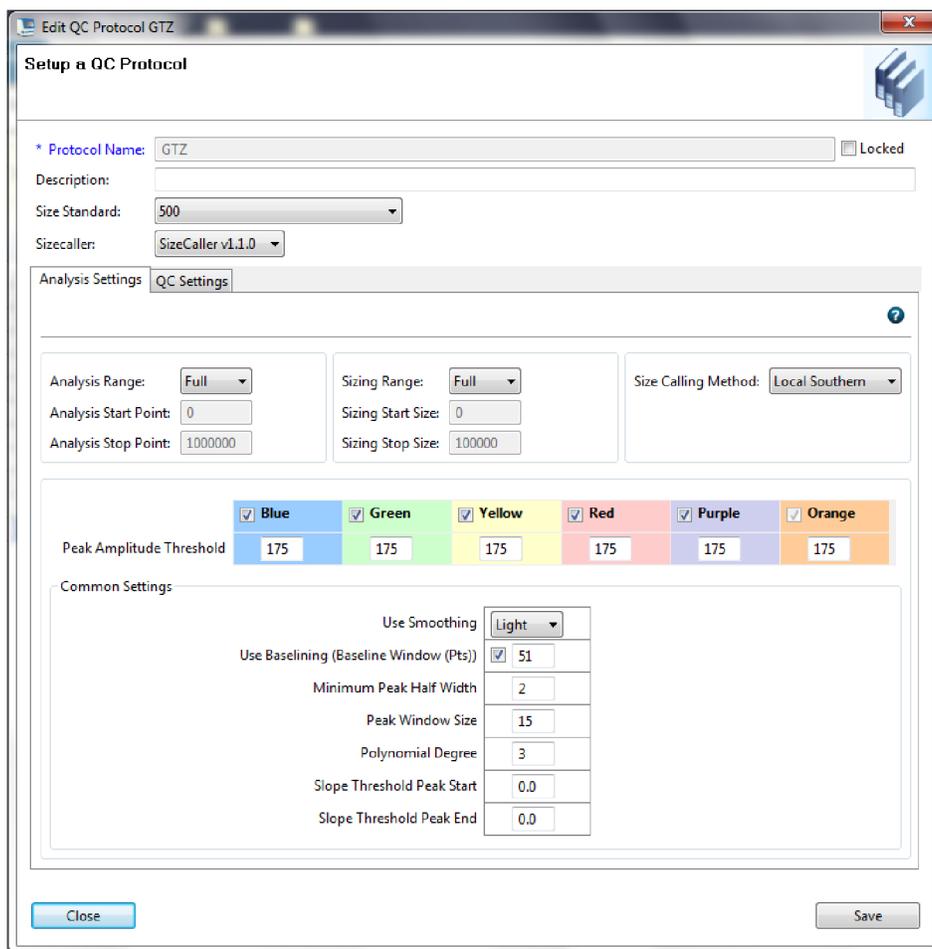


Рисунок 9. Окно создания нового протокола контроля качества Create New QC Protocol.

8.2.5. Чтобы создать новый анализ Assay, перейдите в библиотеку Library. Выберите “Assays” (“Анализы”), затем выберите “Create” (“Создать”). В качестве альтернативы можно использовать ранее созданный анализ Assay. В окне Create New Assay (“Создать новый анализ”; рис. 10) выберите протокол прибора, созданный на шаге 8.2.2, и протокол контроля качества QC protocol, созданный на шаге 8.2.4. Присвойте анализу Assay описательное название. Выберите тип приложения “HID”. Для всех названных образцов на планшете требуется анализ Assay.

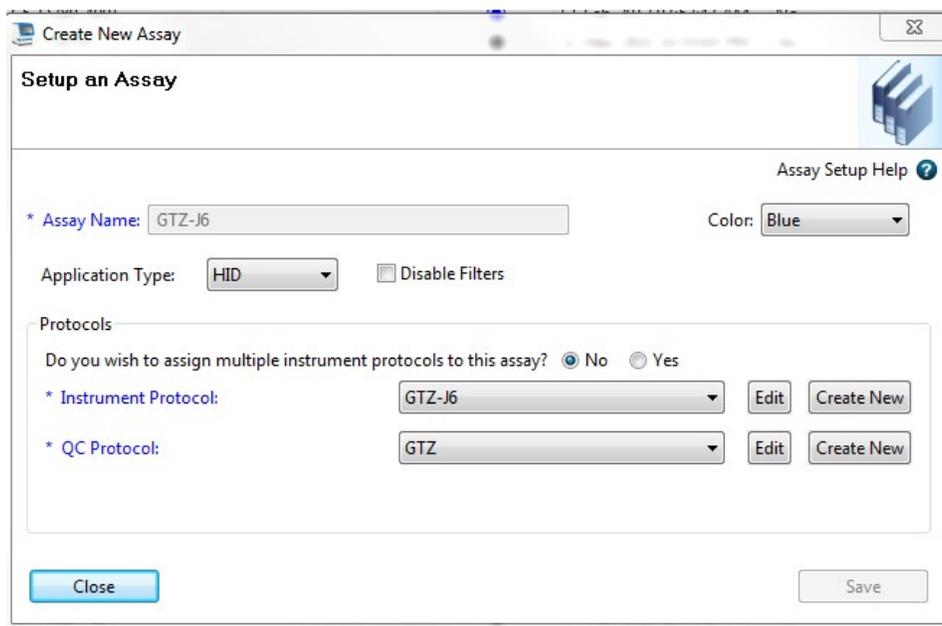


Рисунок 10. Окно создания нового анализа Create New Assay.

8.2.6. Чтобы создать новое соглашение об именах файлов File Name Convention (рис. 11), перейдите в библиотеку Library. Выберите “File Name Conventions” (“Соглашения об именах файлов”), затем выберите “Create” (“Создать”). В качестве альтернативы можно использовать ранее созданное соглашение об именах файлов File Name Convention. Выберите атрибуты имени файла File Name Attributes в соответствии с правилами вашей лаборатории, и сохраните с описательным именем.

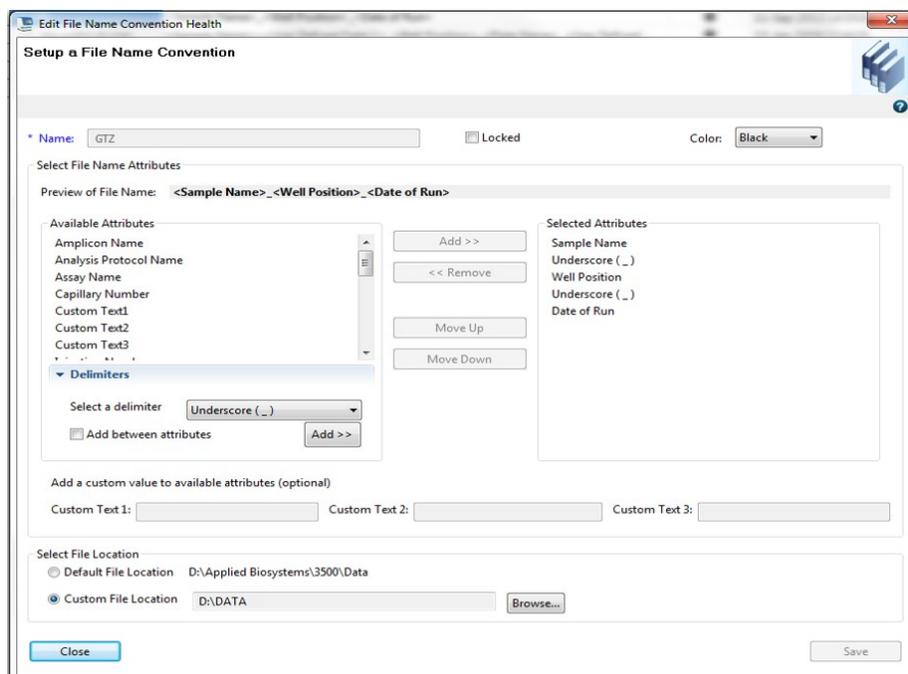


Рисунок 11. Окно создания нового соглашения об именах файлов Create New File Name Convention.

8.2.7. Чтобы создать новую группу результатов Results Group (рис. 12), перейдите в библиотеку Library. Выберите “Results Group” (“Группа результатов”), затем выберите “Create” (“Создать”). В качестве альтернативы можно использовать ранее созданные группы результатов Results Groups. Выберите атрибуты группы результатов Results Group Attributes в соответствии с правилами вашей лаборатории. Сохраните с описательным именем.

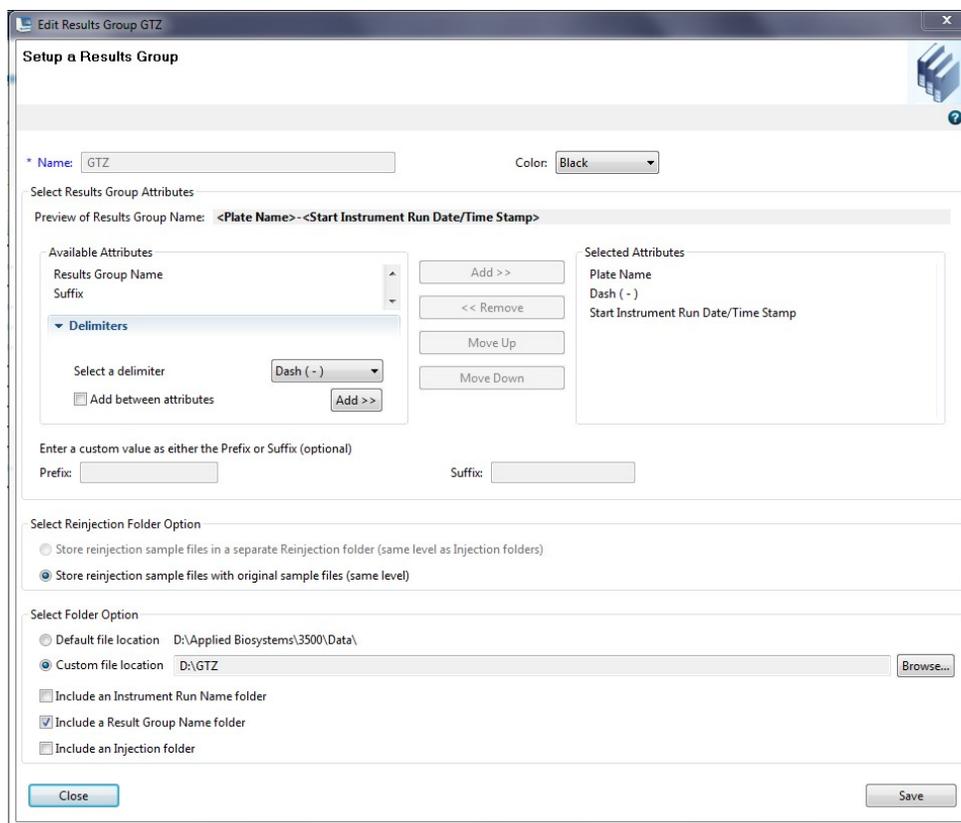


Рисунок 12. Окно создания новой группы результатов Create New Results Group.

8.2.8. Чтобы создать новый планшет New Plate, перейдите в библиотеку Library (рис. 13) и в меню Manage (“Управление”) выберите “Plates” (“Планшеты”) и “Create” (“Создать”).

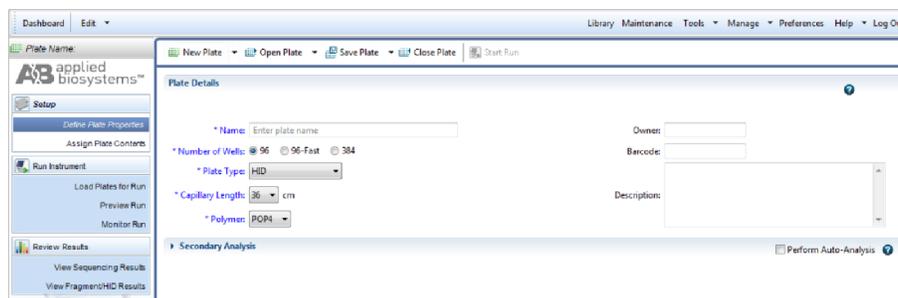


Рисунок 13. Определение свойств планшета.

8.2.9. Присвойте планшету описательное название. В раскрывающемся меню выберите тип планшета “HID”.

8.2.10. Выберите “Assign Plate Contents” (“Назначить содержимое планшета”; рис. 14), присвойте лункам названия образцов. В левой нижней части экрана, в разделе “Assays” (“Анализы”), выберите анализ, созданный на шаге 8.2.5, с помощью опции Add from Library (Добавить из библиотеки). Нажмите на кнопку Add to Plate (“Добавить на планшет”) и закройте окно. В разделе “File Name Convention” (“Соглашение об именах файлов”) выберите соглашение об именах файлов File Name Convention, созданное на шаге 8.2.6, с помощью опции Add from Library (“Добавить из библиотеки”). Нажмите на кнопку Add to Plate (“Добавить на планшет”) и закройте окно. В разделе Results Groups (“Группы результатов”) выберите группу результатов, созданную на шаге 8.2.7, с помощью опции Add from Library (“Добавить из библиотеки”). Нажмите на кнопку Add to Plate (Добавить на планшет) и закройте окно.

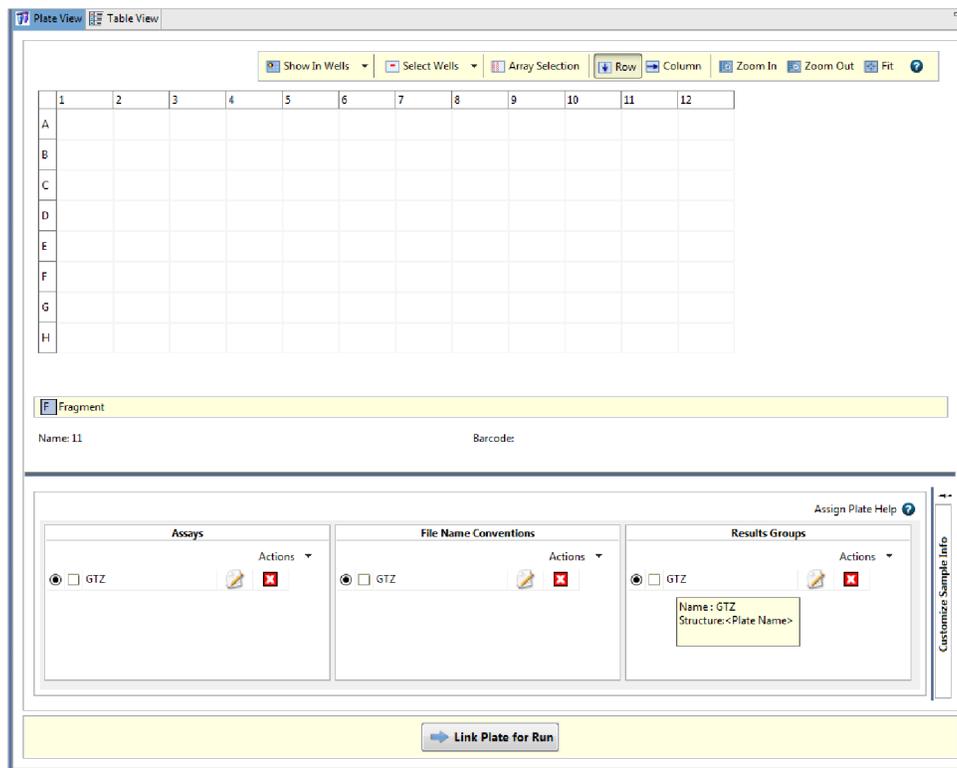


Рисунок 14. Окно назначения содержимого планшета Assign Plate Contents.

8.2.11. Выделите лунки для образцов, а затем установите флажки в разделах Assays (Анализы), File Name Conventions (Соглашения об именах файлов) и Results Groups (Группы результатов), которые относятся к этим образцам. Выберите “Link Plate for Run” (“Связь с

планшетом для прогона”). Появится окно Load Plate (Загрузка планшета), выберите “Yes” (“Да”).

В окне информации о прогоне Run Information (рис. 15) назначьте имя прогона Run Name. Выберите “Start Run” (“Начать прогон”).

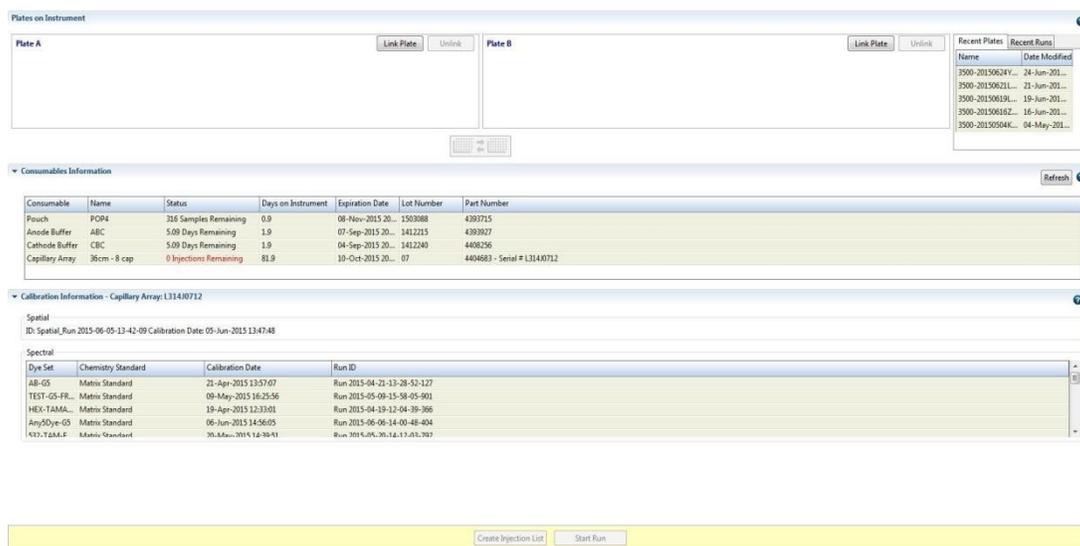


Рисунок 15. Окно информации о прогоне Run Information

9. Анализ данных с использованием программного обеспечения GeneMapper® ID-X версии 1.4

Инструкции в этом разделе написаны с использованием программного обеспечения GeneMapper® версии 1.4. Из-за потенциальных различий между версиями программного обеспечения некоторые инструкции могут быть неприменимы к другим версиям программного обеспечения.

9.1. Импорт панелей, текстовых файлов ячеек

9.1.1. Вызовите приложение GeneMapper® ID-X.

9.1.2. Выберите “Tools” (“Инструменты”), затем “Panel Manager” (“Диспетчер панелей”).

9.1.3. Выберите “File” (“Файл”), затем “Import Panels” (“Импорт панелей”).

9.1.4. Перейдите к текстовому файлу панелей. Выберите файл, затем “Import” (“Импортировать”).

9.1.5. На панели навигации выделите папку панели Набора для идентификации личности Express G28(WT), которую вы только что импортировали на шаге 9.1.4.

9.1.6. Выберите “File” (“Файл”), затем “Import Bin Set” (“Импортировать набор ячеек”).

9.1.7. Перейдите к тексту ячеек. Выберите файл, затем “Import” (“Импортировать”).

9.1.8. В диспетчере панелей Panel Manager установите флажки, указывающие, что Yindel и DYS391 — это Y-маркеры. См. рис. 16.

Примечание: для более старых версий программного обеспечения GeneMapper® ID-X эта опция недоступна.

9.1.9. В нижней части окна диспетчера панелей Panel Manager выберите “ОК”. При этом панели и текстовые файлы ячеек сохраняются, и окно закрывается.

Marker Name	Dye Color	Min Size	Max Size	Control Alleles	Marker	Comments	Y Marker	Internal QC	Ladder Alleles
1 D3S1358	Blue	102.0	155.0	"15, 17"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
2 TH01	Blue	157.0	199.0	"6, 9, 3"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9, 3, 10, 11, 12, 13, 13, 3
3 D21S11	Blue	206.0	273.0	"29, 30"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	24, 24, 2, 25, 26, 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, 37, 38
4 D18S51	Blue	282.0	367.0	"15, 18"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	7, 8, 9, 10, 10, 2, 11, 12, 13, 13, 2, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
5 Fenta E	Blue	373.0	495.0	11	5	none	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
6 Yindel	Green	98.5	106.0	2	5	none	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1, 2
7 DYS391	Green	113.0	160.0	10	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
8 D12S391	Green	160.5	223.0	"18, 24"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
9 D6S1043	Green	233.0	305.0	12	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
10 D2S1338	Green	309.0	390.0	23	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
11 D1S1656	Green	391.0	446.0	"14, 17"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17, 17, 3, 18, 3
12 D4S2366	Green	452.0	496.0	"9, 14"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
13 D6S818	Yellow	120.0	168.0	"11, 13"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
14 D13S317	Yellow	172.0	219.0	11	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
15 D7S820	Yellow	220.0	261.0	11	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
16 D19S433	Yellow	268.0	330.0	"13, 14"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12, 2, 13, 13, 2, 14, 14, 2, 15, 15, 2, 16, 16, 2, 17, 17, 2, 18, 2, 19, 2
17 CSF1PO	Yellow	334.0	361.0	"10, 11"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
18 Fenta D	Yellow	394.0	483.0	"8, 12"	5	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2, 2, 3, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
19 D2S441	Red	83.0	122.0	"11, 12"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	8, 9, 10, 11, 11, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
20 vWA	Red	124.0	192.0	17	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
21 D8S1179	Red	198.0	259.0	"12, 13"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
22 TPOX	Red	264.0	312.0	"9, 9"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
23 FGA	Red	318.0	462.0	"24, 26"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	13, 14, 15, 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, 31, 2, 32, 2, 33, 2, 34, 2, 43, 2, 44, 2, 45, 2, 46, 2
24 AMEL	Purple	103.0	112.0	"X, Y"	6	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	X, Y
25 SEY	Purple	115.0	121.0	SEY	4	none	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SEY, 0
26 D16S539	Purple	123.0	171.0	11	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
27 D22S1045	Purple	173.0	215.0	"16, 18"	3	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
28 SE33	Purple	236.0	371.0	"23, 2, 26, 2"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	4, 2, 6, 3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20, 2, 21, 21, 2, 22, 2, 23, 2, 24, 2, 25, 2, 26, 2, 27, 2, 28, 2, 29, 2, 30, 2, 31, 2, 32, 2, 34, 2, 35, 35, 2, 36
29 D10S1248	Purple	384.0	436.0	"12, 15"	4	none	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18

Рисунок 16. Флажки Y-маркера в программном обеспечении GeneMapper® ID-X версии 1.4.

9.2. Импорт стандарта длины Size Standard в программном обеспечении GeneMapper® ID-X версии 1.4

При создании стандарта длины есть два варианта. Используйте этот протокол или альтернативный протокол, описанный в разделе 9.3.

9.2.1. Выберите “Tools” (“Инструменты”), затем “GeneMapper® ID-X Manager” (Диспетчер).

9.2.2. Выберите вкладку Size Standard (Стандарт длины).

9.2.3. Выберите “Import” (“Импорт”).

9.2.4. Перейдите на вашем компьютере к расположению файла Размер-500.xml.

9.2.5. Выделите файл и выберите “Import” (“Импорт”).

9.2.6. Выберите “Done” (“Готово”), чтобы сохранить изменения и закрыть диспетчер GeneMapper® ID-X.

9.3. Создание стандарта длины Size Standard с помощью GeneMapper® ID-X программного обеспечения версии 1.4

9.3.1. Выберите “Tools” (“Инструменты”), затем “GeneMapper ID-X Manager” (Диспетчер).

9.3.2. Выберите вкладку Size Standard (Стандарт длины).

9.3.3. Выберите “New” (“Новый”).

9.3.4. В окне редактора стандарта длины Size Standard Editor (рис. 17) выберите в качестве группы безопасности “GeneMapper ID-X Security Group” (“Группа безопасности”). Это обеспечивает доступ к программному обеспечению всем пользователям. Могут использоваться другие группы безопасности.

9.3.5. Введите подробное название, например “Размер-500”.

9.3.6. Выберите для красителя стандарта длины Size Standard Dye значение “Orange” (“Оранжевый”).

9.3.7. Введите длины маркеров размера фрагментов ДНК (75, 87, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 и 500 оснований). См. рис. 17.

9.3.8. Нажмите “ОК”.

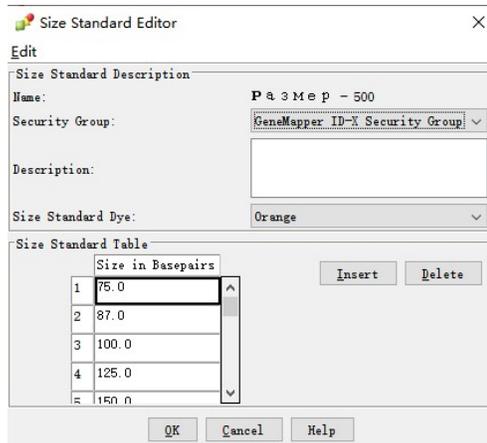


Рисунок 17. Вкладка аллеля Allele программного обеспечения GeneMapper® ID-X версии 1.4.

9.4. Создание метода анализа Creating Analysis Method с помощью программного обеспечения GeneMapper® ID-X версии 1.4

Инструкции предназначены для руководства по началу анализа данных в программном обеспечении GeneMapper® ID-X. Они не предназначены для использования в качестве исчерпывающего руководства по использованию программного обеспечения GeneMapper® ID-X. Для обучения работе с программным обеспечением рекомендуем пользователям обратиться в компанию Thermo Fisher Scientific.

9.4.1. Выберите “Tools” (“Инструменты”), затем “GeneMapper ID-X Manager” (Диспетчер).

9.4.2. Выберите вкладку Analysis Methods (Методы анализа).

9.4.3. Выберите “New” (“Новый”), и откроется диалоговое окно нового метода анализа.

9.4.4. В окне редактора методов анализа Analysis Method Editor выберите в качестве группы безопасности “GeneMapper ID-X Security Group” (“Группа безопасности”).

Это обеспечивает доступ к программному обеспечению всем пользователям. Могут использоваться другие группы безопасности.

9.4.5. Введите для метода анализа описательное название, например “Express G28(WT)-1.0-3500”.

9.4.6. Выберите вкладку Allele (Аллель; рис. 18).

9.4.7. Выберите текстовый файл ячеек, который был импортирован в разделе 9.1.

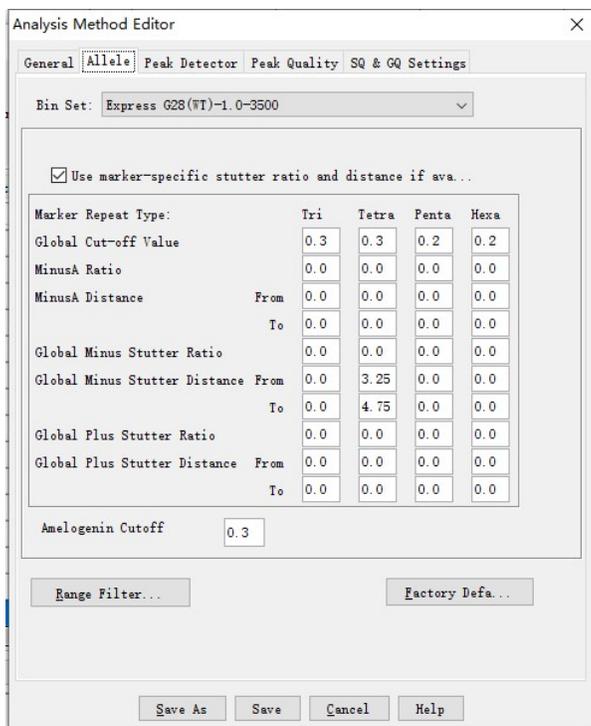


Рисунок 18. Вкладка аллеля Allele программного обеспечения GeneMapper® ID-X.

9.4.8. Выберите вкладку Peak Detector (Детектор пика; рис. 19). Возможно, эти настройки потребуются оптимизировать. Следует провести внутреннюю валидацию.

Примечания.

- 1) Выберите для анализа полный или частичный диапазон. При использовании частичного диапазона выберите на основе ваших данных подходящий диапазон анализа. Выберите начальную точку после пика праймера и непосредственно перед первым определенным пиком маркера размера фрагментов ДНК, чтобы обеспечить правильный размер стандарта маркера размера фрагментов ДНК.
- 2) Пороговые значения амплитуды пика — это минимальные значения высоты пика, при которых программное обеспечение будет вызывать пик. Для анализаторов Applied Biosystems® 3500 и 3500xL Genetic компания Thermo Fisher Scientific предлагает порог анализа в 175 RFU при стандартных условиях впрыска. Однако отдельные лаборатории должны на основе внутренних валидационных исследований определять собственные пороговые значения амплитуды пиков.
- 3) В поле нормализация можно установить флажок, независимо от того, применяли ли во время сбора данных нормализацию.

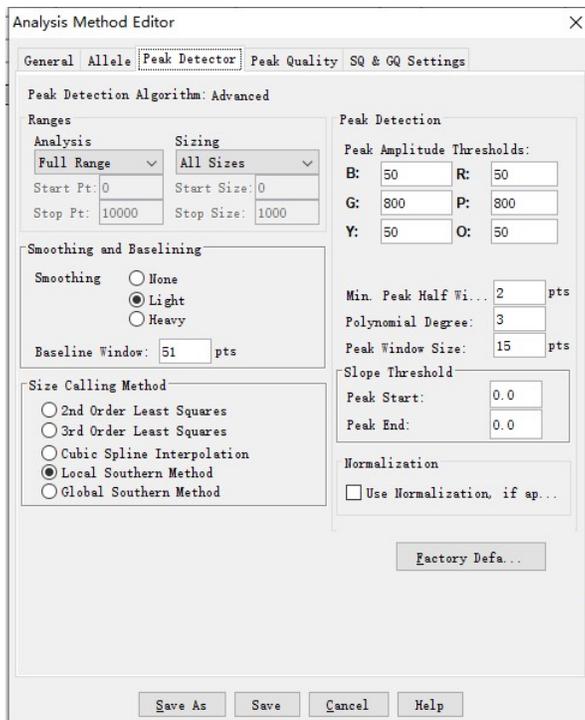


Рисунок 19. Вкладка детектора пика Peak Detector программного обеспечения GeneMapper® ID-X версии 1.4.

9.4.9. Выберите вкладку Peak Quality (Качество пика), чтобы, если применимо, изменить настройки качества пика.

Примечание: дополнительную информацию о шагах 8 и 9 см. в руководстве пользователя GeneMapper® ID-X.

9.4.10. Чтобы при необходимости изменить настройки SQ и GQ, выберите вкладку настроек SQ & GQ Settings.

9.4.11. Чтобы сохранить новый метод анализа, выберите “Save” (“Сохранить”).

9.4.12. Выберите “Done” (“Готово”), чтобы выйти из диспетчера GeneMapper® ID-X.

9.5. Обработка данных для создания базы данных или образцов на установление отцовства

9.5.1. Выберите “File” (“Файл”), затем “New Project” (“Новый проект”).

9.5.2. Выберите “Edit” (“Редактировать”), затем “Add Samples to Project” (“Добавить образцы в проект”).

9.5.3. Перейдите к расположению запущенных файлов. Выделите нужные файлы, а затем выберите “Add to list” (“Добавить в список”), а затем “Add” (“Добавить”).

9.5.4. В столбце Sample Type ("Тип образца") из выпадающего меню выберите “Allelic Ladder” (“Аллельный ладдер”), “Sample” (“Образец”), и подходящий для образца тип “Positive Control” (“Положительный контроль”) или “Negative Control” (“Отрицательный контроль”). В каждой папке в проекте должна содержаться по крайней мере одна инъекция аллельного ладдера, в столбце Sample Type (Тип образца) обозначенная для правильного генотипирования как “Allelic Ladder” (“Аллельный ладдер”). В столбце Analysis Method (Метод анализа) выберите созданный выше метод анализа.

9.5.5. В столбце панелей Panel выберите ранее импортированный текстовый файл панели.

9.5.6. В столбце стандарта длины Size Standard выберите созданный стандарт длины.

9.5.7. Чтобы начать анализ данных, выберите “Analyze” (“Анализировать”; кнопка с зеленой стрелкой).

Примечание: По умолчанию программное обеспечение после проверки качества отображает окна *Analysis Requirement Summary* (сводку требований к анализу), *Allelic Ladder Analysis Summary* (сводку анализа аллельных ладдеров) и *Analysis Summary* (сводку анализа). Убедитесь, что по мере появления каждого окна выполнены все требования. Если окно сводки требований к анализу *Analysis Requirement Summary* у вас не активировано, неполадки может потребоваться устранить вручную.

10. Генотипирование Смесь аллельных ладдеров

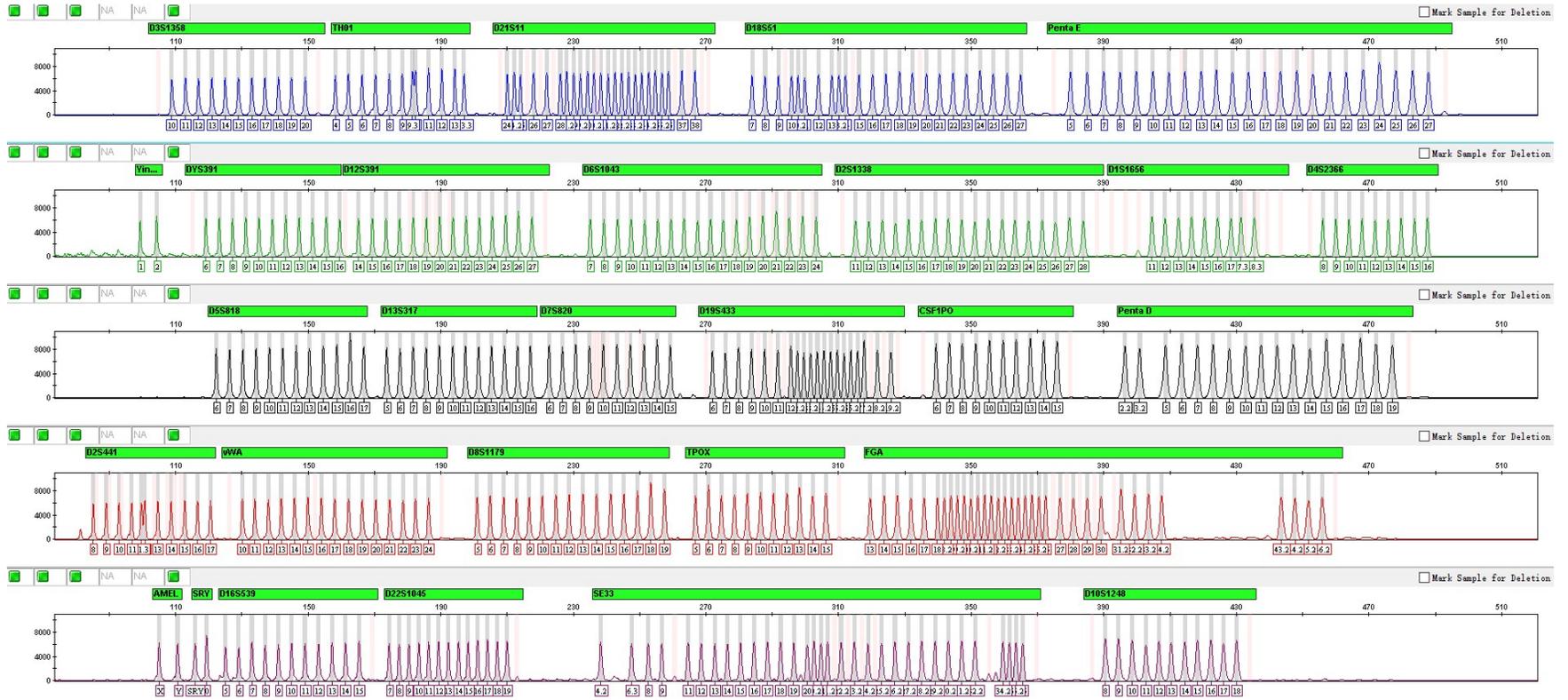


Рисунок 20. Репрезентативные данные для Смесь аллельных ладдеров Express G28(WT) на генетическом анализаторе Applied Biosystems® 3500.

11. Генотипирование Положительного контроля 9948

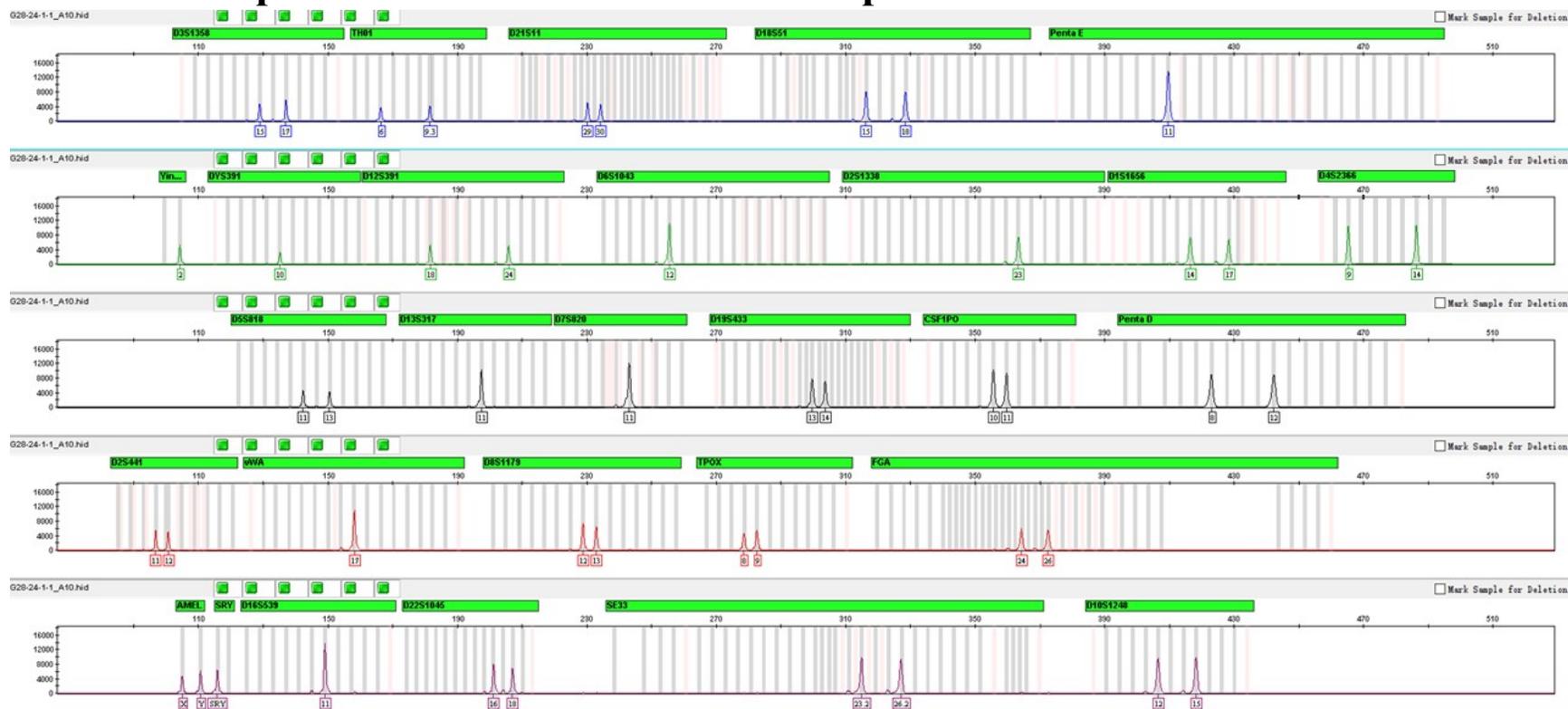


Рисунок 21. Ниже показана амплификация Положительного контроля 9948 с использованием Набор для идентификации личности Express G28(WT).

12. Устранение неполадок

Наблюдение	Возможные причины	Рекомендуемые действия
Отсутствующие или непропорционально высокие аллели/низкое значение пика	Ингибиторы ДНК-полимеразы	Материалы судебно-медицинской экспертизы, поступающие с места преступления, могут содержать внешние ингибиторы: необходимо использовать соответствующий метод очистки.
	Недостаточно матричной ДНК	1) Используйте рекомендуемое количество матричной ДНК; 2) Чтобы увеличить на входе в капилляр количество продукта ПЦР с низким числом копий (LCN), можно использовать несколько методов для улучшения значения пика: деионизация очищенного продукта ПЦР с использованием формамида с низкой электропроводностью, использование меньшего количества внутреннего стандарта, увеличение времени инъекции.
	Недостаточное перемешивание смеси праймеров Express G28(WT) и Мастер-микса Express G28(WT)	Недолго взболтайте на вортексе Смесь праймеров Express G28(WT) и Мастер-микс Express G28(WT), тщательно взболтайте на вортексе готовую смесь.
	Пузырьки на дне пробирки	Перед амплификацией пробирку центрифугируют.

Наблюдение	Возможные причины	Рекомендуемые действия
	Чрезмерная концентрация соли или изменение значения pH	<p>Избыток в образце ДНК молекул K^+, Na^+, Mg^{2+} или ЭДТА, которые могут ингибировать реакцию ПЦР; на реакцию ПЦР может повлиять изменение значения pH.</p> <p>Предлагаем сохранить извлеченную ДНК в буфере TE (pH 8,0, 10 мм Трис-HCl 0,1 мм) или H_2O, не содержащий нуклеаз. Поддерживайте соотношение объема реагентов-матричной ДНК к общему объему как можно меньшим.</p>

	Недостаточный объем реакции	Оптимизированный объем реакции – 25 мкл. Реакционный объем менее 25 мкл содержит более концентрированные ингибиторы, которые могут влиять на амплификацию.
	Проблема с термоциклером, планшетом или центрифужной пробиркой	Пробирки, планшеты и термоциклеры разных марок функционируют по-разному. Если применимо, настоятельно рекомендуем выполнить калибровку.
	Недостаточная концентрация праймера	Используйте рекомендуемый объем смеси праймеров; перед смешиванием для амплификации взболтайте реагент на вортексе.
	Недостаточное количество продукта ПЦР, введенного электрокинетически (либо низкое значение пика внутреннего стандарта)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Проведите повторную инъекцию 2) Исключите утечки геля и воздействие источников света
	Низкое качество формамида	Используйте формамид TM Hi-Di.
	Отсутствие амплификации при положительном контроле	Плохие условия хранения приводят к контролируемой деградации ДНК.

Разные пики	Загрязнен другой матричной ДНК или существующим продуктом ПЦР	Возможно перекрестное загрязнение. Используйте наконечники пипеток с фильтром и строго соблюдайте лабораторные правила по переносу продукта для ПЦР, пути перемещения и направлению давления.
	Может быть загрязнен пробойник лунок	Используйте 1 или 2 пустых лунки в качестве контрольных, чтобы проверить, не загрязнен ли пробойник. Загрязненный пробойник тщательно промойте деионизированной водой и обработайте ультрафиолетом более 8 часов.

	Могут быть загрязнены реагенты для ПЦР или вода	После вскрытия нового комплекта реагенты для амплификации и реагенты для пост-амплификации следует хранить отдельно, в холодильниках пре-амплификации и пост-амплификации. Операторам лаборатории после амплификации запрещается входить в лабораторию амплификации, пока не проведена тщательная уборка.
	STR-амплифицированные неспецифические пики	<ol style="list-style-type: none"> 1) STR-амплификация привела бы к образованию неспецифических пиков, у которых на одну нуклеотидную пару меньше, чем у аллелей. Причина в неполном добавлении А на 3'-конце. После термоциклирования выдержите материал для элонгации при температуре 60°C не менее 15 минут или уменьшите количество циклов. 2) Амплификация избытка ДНК могла привести к увеличению количества неспецифических пиков. 3) Используйте параметры циклирования, рекомендованные для данного комплекта.
	Неспецифические пики для различных условий сохранения продуктов ПЦР	Сигналы о некоторых неспецифических пиках могут усиливаться после хранения продуктов ПЦР в течение 24 часов при температуре 4°C. Рекомендуем хранить продукты ПЦР при температуре -20°C и сокращать время замораживания-оттаивания.

	Нарушенные пики вследствие влияния прибора для электрофореза	<p>1) При незначительном изменении электрического напряжения или перекристаллизации, проходящих мимо источника лазерного излучения, появляются острые пики. Острые пики иногда проявляются только в одном цвете, но обычно — в нескольких цветах. Необходимо подтверждение с помощью электрофореза.</p> <p>2) Загрязнение водой (используемой для работы прибора и разбавления) приводит к появлению неспецифических пиков. Рекомендуем тщательно промыть электродные и буферные пробирки деионизированной водой, а затем повторно разбавить буфер.</p>
--	--	---

	Растянутые или размазанные пики	<p>При высоком значении пика или низком качестве матричного раствора появятся пики растяжения или размытия.</p> <p>1) Необходима еще одна коррекция спектра. Повторно проведите электрофорез.</p> <p>2) Чувствительность разных приборов варьируется. Таким образом, условия впрыска требуется оптимизировать.</p> <p>3) Для образцов с высоким значением пика следует уменьшить объем впрыска или сократить количество циклов.</p>
	Гели	У геля истек срок годности или он долгое время хранился при комнатной температуре.
Аллельный ладдер отличается от образца	Совпадения между аллельным ладдером и смесью праймеров нет	Убедитесь, что аллельный ладдер и смеси праймером получены из одного комплекта. Убедитесь, что аллельный ладдер и образцы прогоняют по тому же маркеру размера фрагментов ДНК и на одном и том же приборе.
	После многократного капиллярного электрофореза образец слегка смещается	После многократного электрофореза температура передних и задних капилляров различается. Для анализа образцов проведите электрофорез ладдеров при тех же температурных условиях, что и выше.

	Низкое качество электрофореза ладдеров	При каждом электрофорезе следует проводить несколько ладдеров.
Интенсивность сигнала с увеличением длины фрагмента уменьшается	Чрезмерное количество матриц	Избыток ДНК потребляет большое количество ДНК-полимеразы <i>Taq</i> , праймеров и dNTP, что влияет на амплификацию фрагмента большой длины.
	Слишком много ингибиторов в матрице	Ингибиторы ПЦР подавляют активность ДНК-полимеразы <i>Taq</i> . Низкая активность ДНК-полимеразы <i>Taq</i> приводит к снижению эффективности амплификации, особенно для более крупных фрагментов.
	Превышена кратность проведения электрофореза с буфером	При каждом электрофорезе количество ионов в буфере уменьшается, снижая его буферную способность. Это замедляет электрофоретическую подвижность заряженных частиц. Чем больше длина фрагмента, тем больше эффект.

	Ухудшение качества геля	Ухудшение качества геля приводит к повышению электрофоретической стойкости. Чем больше длина фрагмента, тем больше эффект.
	Превышено количество капиллярных электрофорезов	После каждого электрофореза некоторые остатки гелей и примесей могут прилипать к стенкам капилляра; чем меньше диаметр капилляра, тем больше сопротивление фрагмента большей длины.
	Неполная деградация матрицы	Матричная ДНК частично разрушается нуклеазой, ультрафиолетовым излучением или кислотой/щелочью. Уменьшено количество матриц фрагментов большой длины.
Недостаточно данных электрофореза	Слишком низкая температура окружающей прибор среды	Прибор для электрофореза оптимально функционирует при температуре 25°C. Чем ниже температура, тем меньше диаметр пор геля и тем медленнее при электрофорезе перемещаются фрагменты. Поэтому даже при одинаковой продолжительности электрофореза при температуре ниже 25°C данных получают недостаточно. Для получения полного объема данных увеличьте время электрофореза или температуру окружающей среды.

<p>Количество капилляров, прошедших спектральную калибровку, меньше рекомендуемого</p>	<p>Использован некачественный формамид</p>	<p>Качество формамида крайне важно. Используйте формамид Hi-Di™. Замораживайте формамид в аликвотах при температуре -20°C. Многократные циклы замораживания-оттаивания или хранение при температуре 4°C могут привести к разрушению формамида. Некачественный формамид может содержать ионы, которые конкурируют с ДНК во время инъекции, что приводит к снижению высоты пика и уменьшению чувствительности.</p>
	<p>Матричная стандартная смесь была слишком разбавлена</p>	<p>Слишком разбавленная матричная стандартная смесь вызывает при спектральной калибровке низкие пики, что может привести к сбою спектральной калибровки. Увеличьте объем разбавленного Стандарта матрицы 6 -спектра, добавляемого к формамиду Hi-Di™ во время подготовки образца.</p>
	<p>Матричная стандартная смесь был слишком концентрированной</p>	<p>Если матричная стандартная смесь слишком концентрированная, спектральная калибровка может сбиться из-за насыщенных пиков, просачивания или чрезмерного вычитания в других цветах красителя. Во время подготовки матричного образца уменьшите объем добавляемого в формамид Hi-Di™ разбавленного Стандарта матрицы 6-спектр.</p>

	<p>Чтобы узнать причину сбоя, проверьте журнал событий Event Log на экране состояния прибора Instrument Status (например, заказ неправильного красителя или слишком много кандидатов для спектральной калибровки).</p>	<p>Проверьте представление необработанных данных о вышедших из строя капиллярах в средстве просмотра спектра Spectral Viewer (вышедшие из строя капилляры заштрихованы на диаграмме планшета коричневым цветом). До достижения матричной смесью максимума проверьте признаки низкого сигнала, высокого сигнала или базового шума. Отрегулируйте условия прогона, как описано ниже, и повторно установите матричную стандартную смесь.</p> <p>Если причина сбоя после просмотра журнала события Event Log и средства просмотра спектра Spectral Viewer остается неясна, для устранения неполадок рекомендуем промониторировать миграцию фрагментов в средстве просмотра капилляров Capillaries Viewer во время прогона спектральной калибровки. Повторно введите матричную стандартную смесь и во время прогона следите за средством просмотра капилляров Capillaries Viewer.</p> <p>Обратите внимание на образование любых необычных пиков или чрезвычайно низкие или высокие значения высоты пика. На основе информации, полученной при наблюдении средства просмотра капилляров Capillaries Viewer, вам может потребоваться скорректировать условия прогона.</p>
--	--	--