

Инструкция по постановке реакции амплификации в режиме реального времени с набором для количественного определения общей и мужской ДНК, степени деградации и наличия ингибиторов Investigator® Quantiplex PRO (производства компании Qiagen) на приборе 7500 Real-Time PCR Systems, настройке, запуску и анализу в программе HID SDS 1.X.

Постановка реакции Quantiplex Pro

1. Подготовка прибора 7500 Real-Time PCR Systems для анализа: включите компьютер, дождитесь загрузки ОС, включите прибор и дождитесь постоянного зелёного цвета лампочки на приборе; запустите ПО HID SDS.

2. Подготовка рабочего места

Требуемое дополнительное оборудование и расходные материалы:

- вортекс,
- микроцентрифуга,
- пробирки 0,2 мл или 1,5 мл для стандартов,
- 0,2 мл пробирки в стрипах или отдельно,
- 96-луночные плашки,
- стрипы, оптически прозрачные крышки, пленка,
- подставка для пробирок (плашки),
- наконечники,
- дозаторы,
- емкость для отработанных наконечников и пробирок,
- фломастер,
- калькулятор.

Вам также потребуется буфер, входящий в состав набора или деионизованная вода для приготовления ДНК-стандартов.

Перед работой обработайте зону постановки ПЦР спиртом или раствором DNAzap, а после этого - УФ-излучением в течение не менее 30 мин!

При постановке RT-PCR используйте только безталковые (неопудренные) перчатки.

Извлеките реагенты набора Quantiplex Pro из холодильника.

Состав набора Quantiplex Pro:

Каталожный номер – 387216
Количество реакций в наборе – 200
Хранить до первого использования при температуре 18–20°C
Реакционная смесь «Quantiplex Pro Reaction Mix»: 1 пробирка объемом 1,9 мл
Смесь праймеров «Quantiplex Pro Primer Mix»: 1 пробирка объемом 1,9 мл
Контрольная мужская ДНК М1 (50 нг/мкл) 0,2 мл
Буфер для разведения нуклеиновых кислот QuantiTect® – 1 флакон

Если вы открываете набор первый раз, то необходимо разморозить его, извлечь из холодильника и поставить в защищённое от света место. После этого необходимо встряхнуть пробирки с реакционной смесью и праймерами на вортексе, затем быстро, в течение 5–10 секунд, центрифугировать до 10000 об/мин.

Если необходимо сделать аликвоты составляющих набора, то лучше это сделать после размораживания. После этого аликвоты хранить в холодильнике при температуре 2–8°C.

Подготовьте все образцы ДНК, предназначенные для анализа. Встряхните их на вортексе и быстро отцентрифугируйте.

Очень важно: центрифугирование необходимо для того, чтобы на стенках и крышке пробирок не было капель с экстрагированной ДНК.

Расположите все образцы ДНК в нужном порядке на штативе.

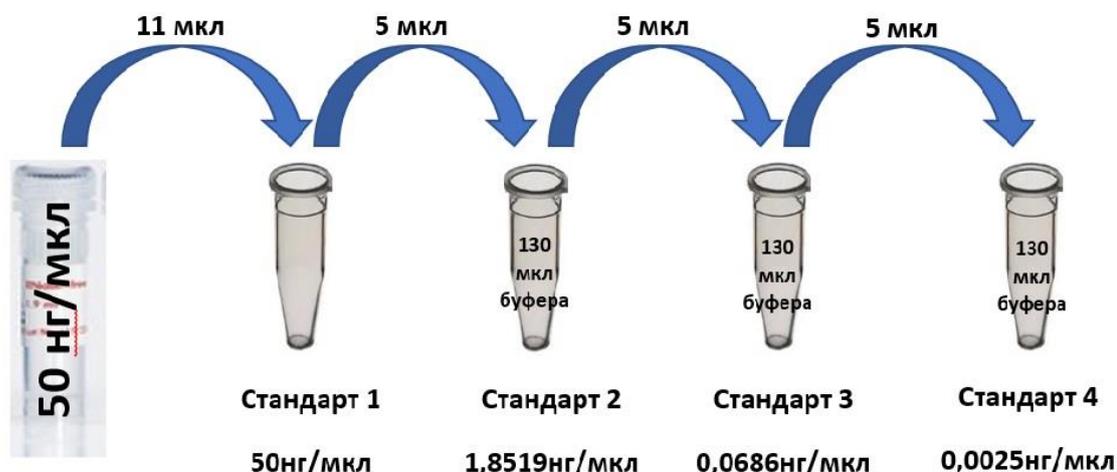
3. Приготовьте ДНК-стандарты:

Тщательно встряхните на вортексе пробирку со стоковым раствором ДНК стандарта, после чего быстро открутите её. Избегайте перекрестного загрязнения.

Внесите в пробирки с будущими Стандартами 2,3,4 по 130 мкл буфера для разведения или воду.

Приготовьте 4 разведения стандартной ДНК ориентируясь на следующую схему:

Стандарт	Концентрация (нг/мкл)	Разведение	Кратность разведения
Стандарт 1	50 нг/мкл	11 мкл (после переноса 5мкл в Стандарт 2 в данной пробирке остается 6 мкл стандартной ДНК, которой достаточно для трех постановок ПЦР)	Без разведения
Стандарт 2	1,8519	5 мкл (стандарт 1)+ 130 мкл буфера	1:27
Стандарт 3	0,0686	5 мкл (стандарт 2)+ 130 мкл буфера	1:27
Стандарт 4	0,0025	5 мкл (стандарт 3)+ 130 мкл буфера	1:27



Первая пробирка содержит неразведенную ДНК в концентрации 50нг/мкл, объем вносимого в нее стандарта из пробирки, входящей в набор, зависит от количества планируемых постановок ПЦР в течение недели, т.к. разведенные стандарты сохраняют стабильность в течение недели (при хранении при температуре 2–8°C).

Приготавливая очередное разведение ДНК-стандарта, встряхните его на вортексе и быстро отцентрифугируйте. Используйте отдельные носики для приготовления всех 4-х стандартов. Распечатайте документ-плашку, в которой укажите последовательность расположения образцов ДНК, стандартов и К-. При расчёте компонентов реакции делайте поправку на вероятную ошибку ручного пипетирования (+1 образец на каждую десятую лунку планшета или пробирку. Также учитывайте реакцию для К-

Рассчитайте и приготовьте ПЦР-смесь в отдельной 1,5 мл пробирке исходя из следующего расчёта:

Компонент	Объем на реакцию 20 мкл	Кол-во на n реакции
Реакционная смесь «Quantiplex Pro Reaction Mix»	9 мкл	9 мкл x n (+10%)
Смесь праймеров «Quantiplex Pro Primer Mix»	9 мкл	9 мкл x n (+10%)
Итого	18 мкл	18 мкл
ДНК	2 мкл	2 мкл

4. Смешайте реагенты, встряхните пробирку с ПЦР-миксом на вортексе, а затем быстро отцентрифугируйте.

5. Приготовьте реакционную 0,2 мл плашку, стрипы или пробирки, поставьте на чёрный штатив. Правильно сориентируйте плашку или стрипы на штативе.

6. Разнесите по 18 мкл ПЦР-смеси в каждую лунку плашки, стрипа или пробирки.

7. Добавить по 2 мкл каждого ДНК-стандарта в соответствующие лунки.

Ориентировочное расположение стандартов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St 1											
B	St 2											
C	St 3											
D	St 4											
E	K-											
F												
G												
H												

8. Добавить образцы ДНК в соответствующие лунки по 2 мкл.

9. Добавить 2 мкл воды в лунку с отрицательным контролем.

10. Закрыть плашку оптически прозрачной плёнкой или оптически прозрачными крышками (пробирки или стрипы- оптически прозрачными крышками)

11. Центрифугировать пробирки (стрипы или плашку) в течении 20 сек при 10000об/мин, до отсутствия пузырей в пробирках или лунках планшета, а также до отсутствия капель на крышках пробирки или пленке планшета. В случае отсутствия плашечной центрифуги можно резко осадить плашку рукой.

12. Установите в прибор готовые для анализа стандарты и образцы.

13. В программе HID SDS создайте плашечный документ

Создание плашечного документа в программе HID SDS

1. Откройте ПО HID SDS, дважды кликнув по иконке, расположенной на рабочем столе. Зайдите в ПО как "Log-in as a guest".

Если вы используете файл шаблона, нажмите Новый анализ/по Шаблону (рисунок 1) и перейдите к этапу 13, для назначения целей на схеме планшета. Затем перейдите к этапу 17, для сохранения и запуска цикла. Если вы не пользуетесь файлом шаблона, перейдите к этапу 10. Файл шаблона загружает настройки для запуска цикла с использованием Investigator Quantiplex Pro, включая настройки стандартной кривой, профиль цикла и целевые объекты для обнаружения флуоресценции. Скачайте файлы матрицы со страницы с ресурсами для продуктов www.qiagen.com/QPpro-template-files или обратитесь к официальному дистрибьютору компании QIAGEN в России для получения необходимых настроек.



Рисунок 1. Начало нового анализа по шаблону.

Если вы не используете файл шаблона, выберите Расширенные Настройки, нажав на стрелку под Мастером Настройкой (рисунки 2 и 3).

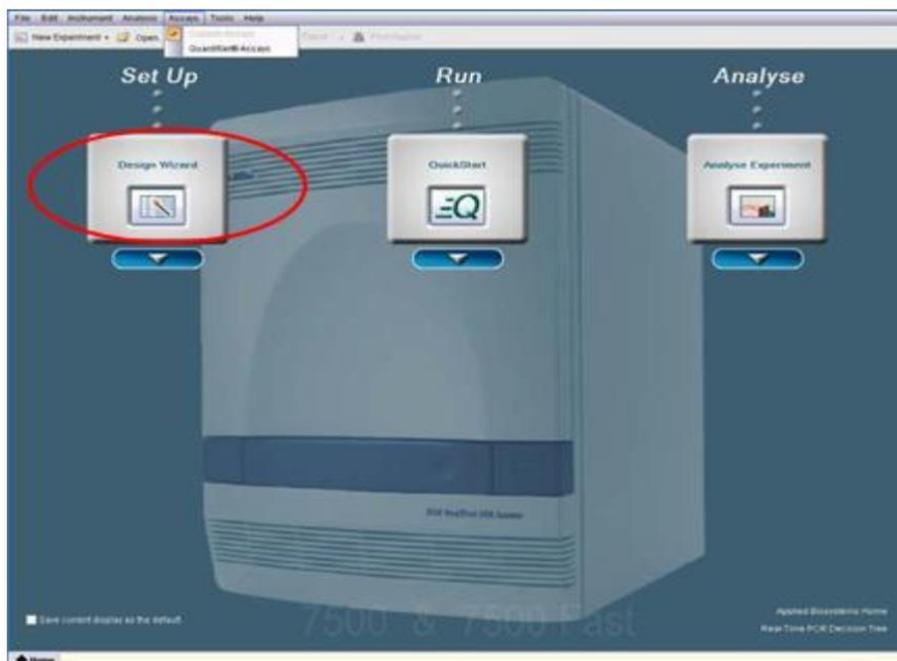


Рисунок 2. Запуск нового анализа.

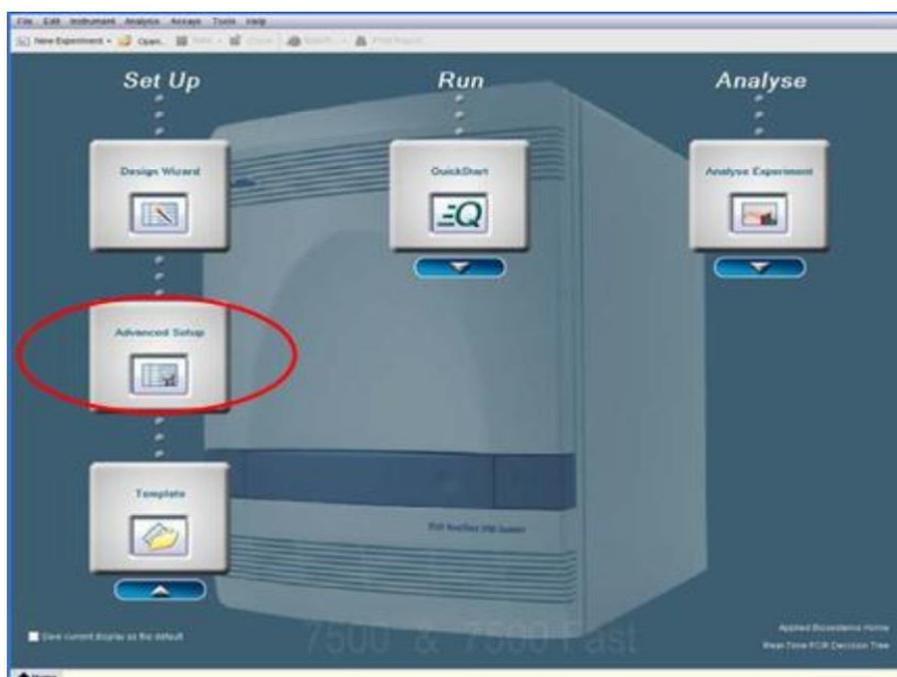


Рисунок 3. Запуск нового анализа с использованием расширенных настроек.

11. После открытия нового окна введите название нового анализа в соответствующем поле. Выберите следующие настройки (рисунок4):

Υ Анализатор: 7500 (96 ячеек)

Υ Тип анализа: Количественное определение – Стандартная кривая

Υ Реагенты: Реагенты TaqMan

Υ Скорость панели: Стандартная

Υ Снимите выделение с функции включить кривую плавления

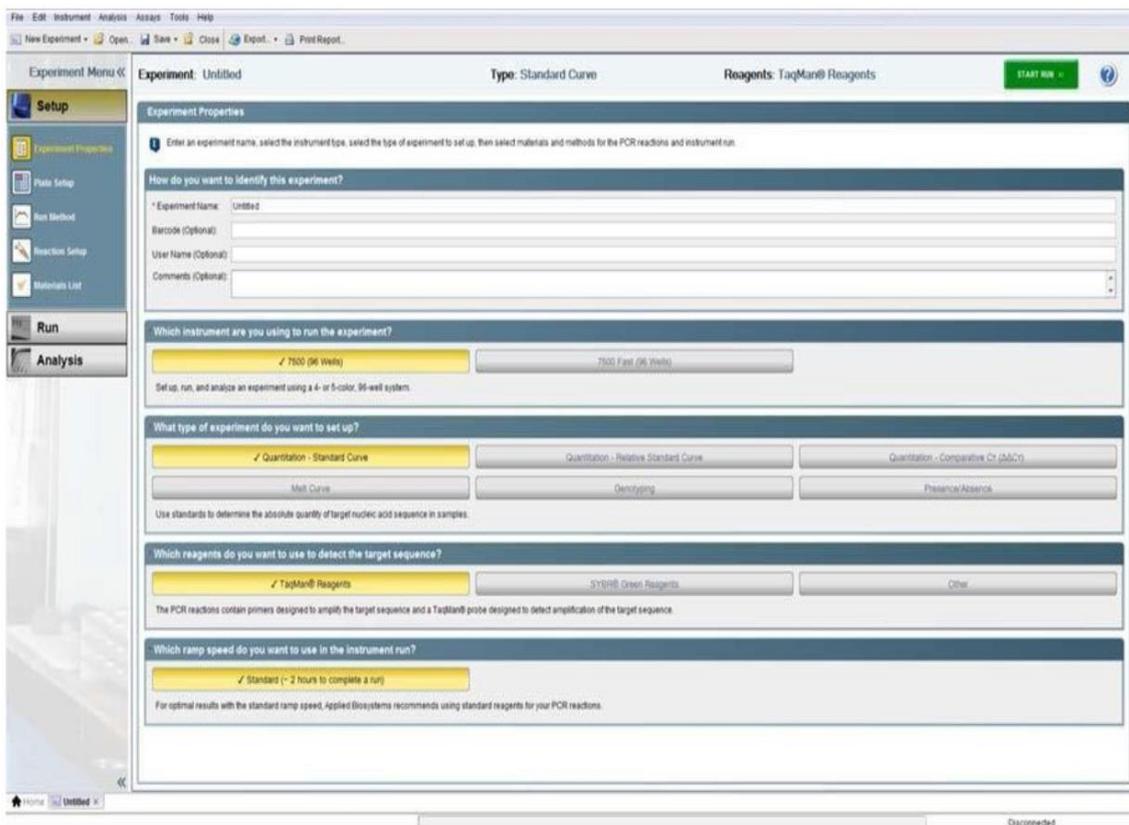


Рисунок 4. Выбор правильных настроек "параметров анализа".

12. Нажмите настройка планшета и укажите четыре целевых продукта, дважды нажав добавить новый целевой продукт. Выберите следующие настройки (рисунок 5):

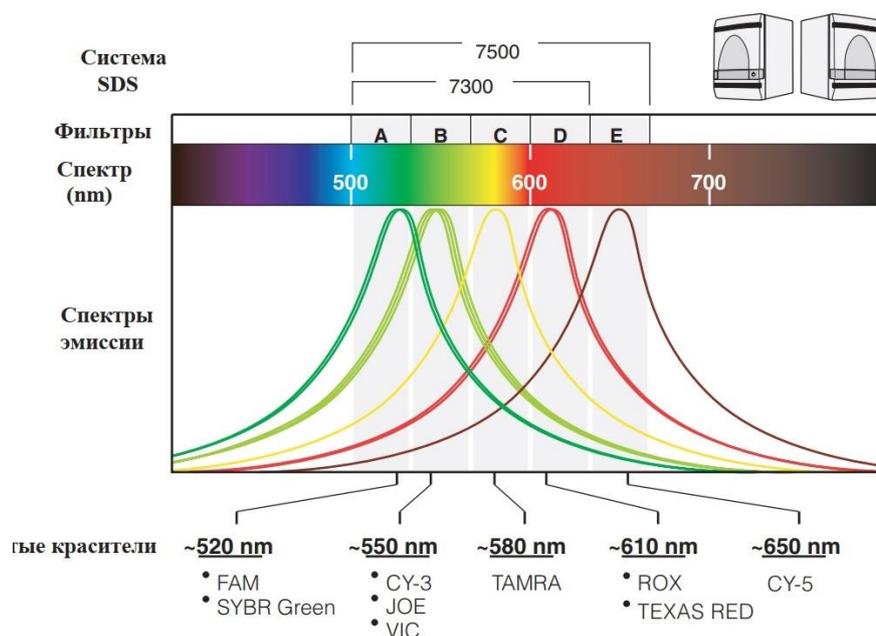
Υ Человек, репортер: FAM, гаситель люминесценции: Нет

Υ ВК, репортер: JOE, гаситель люминесценции: Нет

Υ Распад, репортер: TAMRA, гаситель люминесценции: Нет

Υ Мужской образец, репортер: Су5, гаситель люминесценции: Нет

В стандартный калибровочный набор 7500 Real-Time Applied Biosystems входят следующие красители: FAM, NED, ROX, TAMRA, VIC, SYBR Green I, JOE. Также она может быть откалибрована по трем дополнительным красителям: CY-3, CY-5, Mustang Purple и TEXAS RED (закупаются отдельно).



ВАЖНО!

При использовании набора Investigator Quantiplex Pro с системой для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems 7500 для новых красителей не требуется частной калибровки. Тем не менее, перед началом работы следует убедиться, что система откалибрована для применения стандартных красителей FAM, JOE, TAMRA и Cy5. Для правильной настройки просмотрите руководство пользователя анализатора.

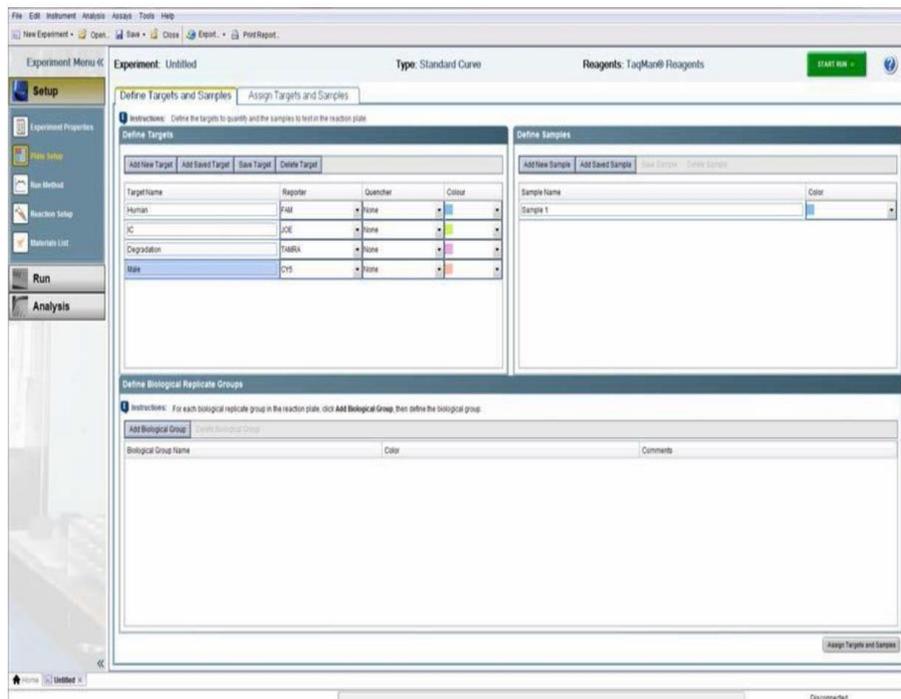


Рисунок 5. Выбор правильных настроек "целевых продуктов".

13. Укажите названия образцов и стандартных реагентов (например, стандарт 1 или Std1, стандарт 2 или Std2 и т.д.) посредством инструмента Задать названия образцов на панели справа. Присвоение названий стандартным реагентам необходимо для надлежащего последующего анализа с использованием инструмента для обработки результатов количественного определения QIAGEN.

Важно: При необходимости повторных циклов их следует задать до перехода к следующему этапу. Задайте повторные анализы, используя названия образцов или на панели Задать группы повторных анализов биологических материалов Если вы используете файл шаблона, перейдите к этапу 17, для сохранения и запуска цикла.

14. Перейдите к вкладке назначить целевые продукты и образцы. На схеме планшета выберите используемые ячейки и назначьте все четыре целевых продукта, отметив ячейки галочкой (рисунок 6).

Важно: Не отмечайте неиспользуемые ячейки (т.е. ячейки без реакционной смеси). Включение в реакцию неиспользуемых ячеек в значительной мере повлияет на масштаб оси X и Y при отображении результатов.

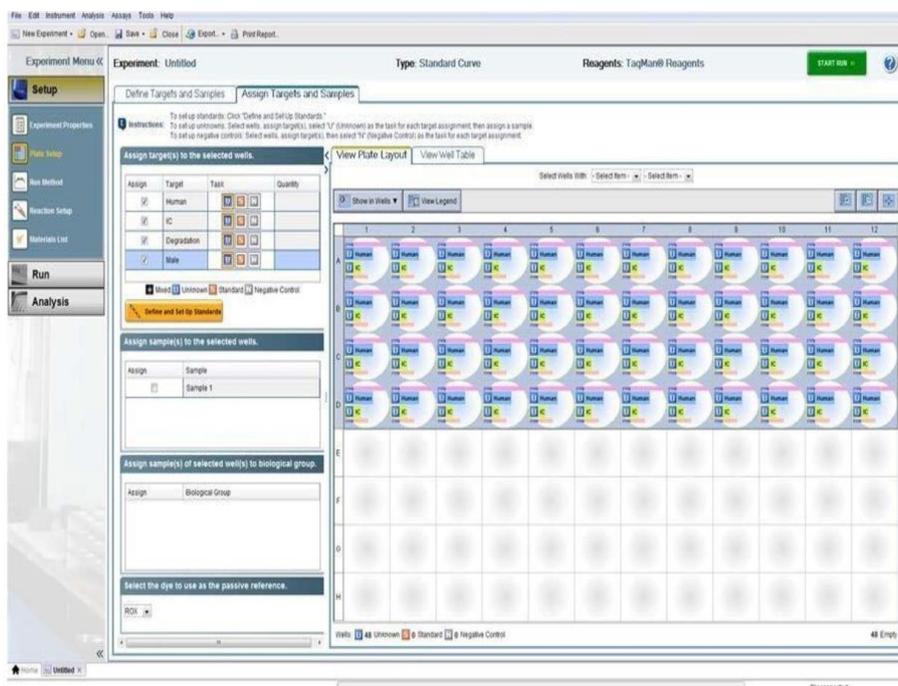


Рисунок 6. Назначение целевых продуктов.

15. Выберите ячейки для контроля без матрицы (NTC) и отметьте их, как отрицательный контроль с помощью серой кнопки N. Примечание: Оставьте значение анализа ВК (JOE) в реакциях NTC Неизвестно. Введите название образца.

16. Выберите ячейки для стандартной кривой и отметьте их, как стандартные с помощью оранжевой кнопки S. Выберите количество для соответствующего детектора и введите количество ДНК в ячейке в соответствии с таблицей 2.

Важно: Хотя в поле Количество не указываются единицы измерения, для всех количественных параметров стандартов следует применять общие единицы (например, нг/мкл). Единицы измерения для указания количества стандартных реагентов обозначают единицы измерения для анализа результатов.

Примечание: Оставьте значение анализа ВК (JOE) в реакциях стандартных реагентов, как Неизвестно.

17. Назначьте образцы по схеме планшета, нажимая на ячейки и помечая соответствующее окошко на панели слева (рисунок 7).

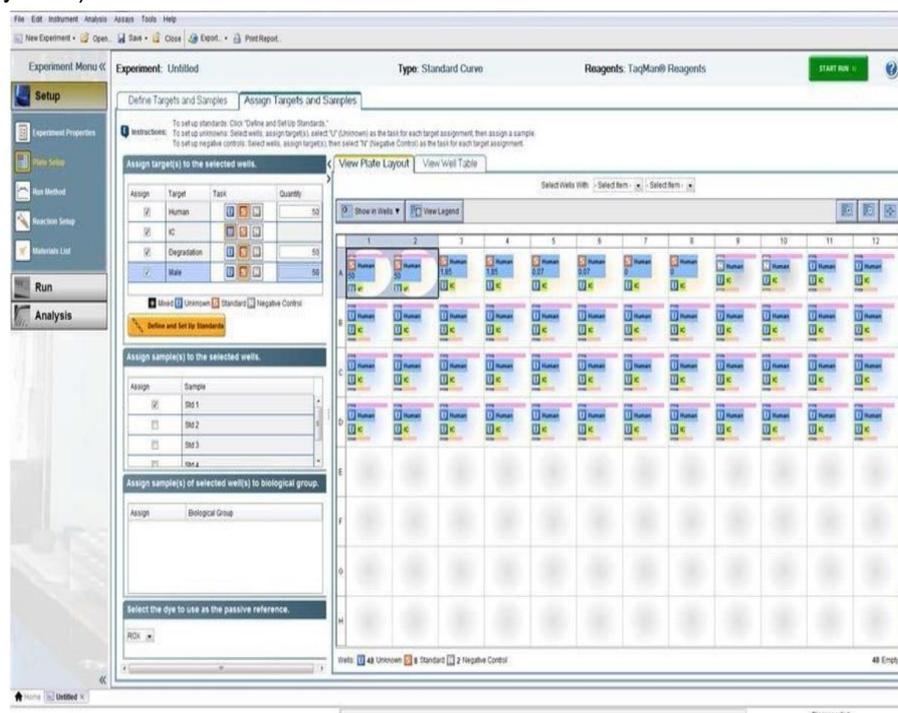


Рисунок 7. Введение названия образца и назначение образцов.

18. Нажмите Метод цикла. Запрограммируйте циклер в соответствии с данными в таблице 5.

Таблица 5. Протокол цикла с использованием системы для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems 7500 для идентификации личности

Этап	Температура	Время	Количество циклов	Комментарий
Начальный этап активации ПЦР	95°C	3 мин	–	Для ПЦР требуется начальный подогрев при температуре 95°C для активации ДНК полимеразы
Цикл в 2 этапа:				
Денатурирование	95°C	5 с	40	
Совокупный отжиг/удлинение	60°C	35 с	Произведите регистрацию флуоресценции	

19. В температурном профиле измените время задержки на показатели из таблицы 5. Измените объем образца на 20 мкл (рисунок 8). Сбор данных следует проводить во время этапа совокупного отжига/удлинения.

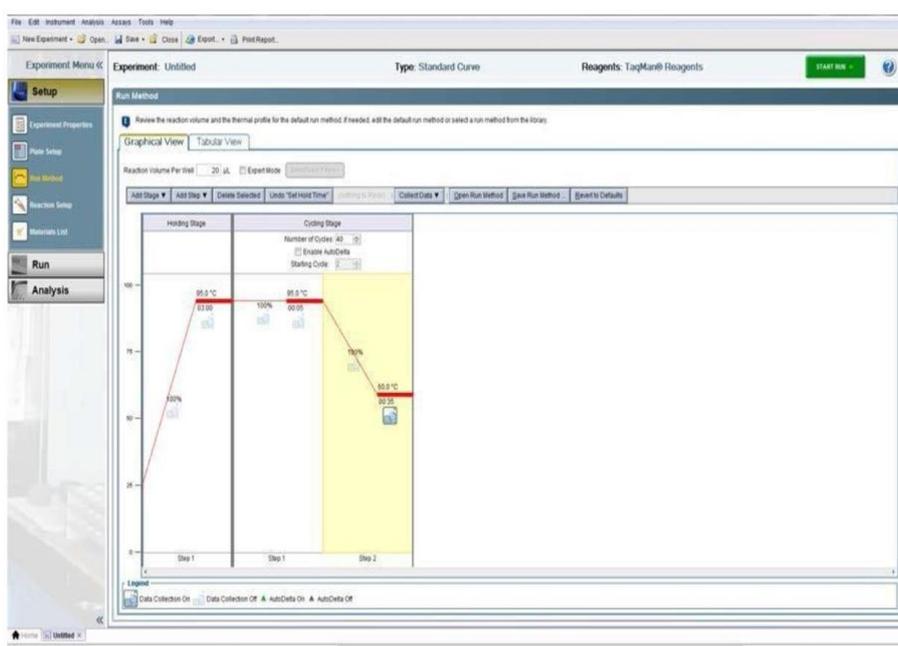


Рисунок 8. Коррекция температурного профиля (HID программное обеспечение для анализа ПЦР в реальном времени 1.2).

20. Перед запуском цикла анализа планшета с реакционной смесью сохраните настройки планшета в формате EDS (*.eds). Нажмите файл, и затем сохранить. Введите название документа настроек планшета, после чего снова нажмите сохранить.

21. Загрузите планшет в анализатор. Убедитесь, что положение A1 планшета находится в верхнем левом углу лотка.

22. Запустите реакцию, нажав кнопку старт.