

## Постановка ПЦР с помощью набора для амплификации STR-локусов Investigator 24Plex QS Kit в объеме 25 мкл

Комплектация набора

Investigator 24plex QS Kit	(100)	(400)
№ по каталогу	382415	382417
Количество реакций по 25 мкл	100	400
Fast Reaction Mix 2.0	750 мкл	4 × 750 мкл
Nuclease-free water	1,9 мл	4 × 1,9 мл
Primer Mix 24plex QS	250 мкл	4 × 250 мкл
Control DNA 9948 (0,1 нг/мкл)	200 мкл	200 мкл
DNA size standard 24plex (BTO)	55 мкл	220 мкл
Allelic ladder 24plex	25 мкл	3 × 25 мкл

### Порядок работы

1. Разморозьте компоненты ПЦР и контрольную ДНК (9948). Тщательно перемешайте. Кратковременно центрифугируйте перед использованием.
2. Приготовьте мастер-микс согласно таблице 1.

Таблица №1 Постановка реакции

Компонент	Объем на одну реакцию	Кол-во на n реакций
Реакционная смесь	7,5 мкл	7,5 мкл × n (10%)
Праймер Микс	2,5 мкл	7,5 мкл × n (10%)
ДНК	15 мкл	15 мкл

Поскольку возможна потеря реактивов при переносе, приготовьте смесь с учетом возможных дополнительных реакций. Необходимо также учесть реакции с положительным и отрицательным контролями.

3. Тщательно перемешайте и кратковременно центрифугируйте микс, после чего разнесите по 10 мкл в пробирки для ПЦР или лунки планшета для ПЦР.
4. Приготовьте положительный и отрицательный контроли.  
Положительный контроль: используйте 5 мкл (т. е. 500 пг) Control DNA + 10 мкл nuclease-free water (дионизованная вода). Отрицательный контроль: Используйте в реакции nuclease-free water (дионизованная вода). Добавьте в соответствующие лунки по 15 мкл положительного и отрицательного контроля.
5. Добавьте по 15 мкл образца в соответствующие лунки\*.

*\*Рекомендуемое количество ДНК в стандартных условиях составляет 0,5 нг. Внутренние валидационные испытания продемонстрировали получение достоверных и сбалансированных результатов при использовании 0,2–2 нг ДНК и надежных результатов при использовании <0,1 нг ДНК*

*Если в процессе валидационных исследований вашей лаборатории результаты электрофореза будут отображать избыток ДНК (высокая интенсивность флуоресцентного сигнала), то при постановке ПЦР необходимо внести в смесь 5 мкл ДНК+10 мкл H<sub>2</sub>O. Если отображается недостаток ДНК, тогда внесите в смесь 15мкл ДНК.*

6. Запрограммируйте амплификатор согласно таблицы.

Температура	Время	Количество циклов
98°C*	30 с	3 цикла
64°C	55 с	
72°C	5 с	
96°C	10 с	27 циклов
61°C	55 с	
72°C	5 с	
68°C	2 минуты	-
10°C	2 минуты	∞

*\*Горячий старт для активации ДНК-полимеразы*

7. 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.

### Подготовка образцов к электрофорезу

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 таблицы.

Компонент	Объем на один образец
Hi-Di Formamide	12,0 мкл
DNA Size Standard 24plex (BTO)	0,5 мкл

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°C.
7. Быстро заморозьте, поместив планшет на лед на 3 мин.
8. Вместо этого можно охладить планшет с помощью термоциклера, установленного на 4°C.
9. Поместите планшет в генетический анализатор и приступите к запуску электрофореза.

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 Hi-Di Formamide.