«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ООО «АМГен Бел»

_____ Д.И.Костюкович
«12» _____ 2025 г.

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

# НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ STR-АНАЛИЗА ДНК МАРКЕРОВ ЧЕЛОВЕКА «AMGene Human 23 ID-Plex»

«СОГЛАСОВАНО»
Заместитель директора
УП «Центр экспертиз
и испытаний в здравоохранении»

_____ О.Б.Журавлева
«26» _____ 2026г.

«СОГЛАСОВАНО»
Директор ГУ «Республиканский
научно-практический центр детской
онкологии, гематологии и
иммунологии»

_____ А.В.Солнцева
"29" _____ 2026 г.

2025

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор «AMGene Human 23 ID-plex» предназначен для решения задач в области клинико-лабораторной диагностики, связанных с идентификацией личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 23 маркеров геномной ДНК человека: D3S1358, D13S317, D1S1656, CSF1PO, D2S441, D5S818, TH01, FGA, D8S1179, D21S11, D16S539, TPOX, D10S1248, D22S1045, D19S433, D7S820, D18S51, vWA, D2S1338, D12S391, Амелогенин, Y indel и DYS391.

Набор «AMGene Human 23 ID-plex» представляет собой тест-систему для генотипирования ДНК человека методом мультиплексной ПЦР, в результате которой происходит одновременная амплификация 20 аутосомных STR-маркеров и 3-х пол-специфических маркеров.

Продукты мультиплексной ПЦР разделяются методом капиллярного электрофореза на автоматизированных генетических анализаторах. Для детекции амплифицированных фрагментов ДНК в наборе использованы шесть типов флуоресцентных красителей, которые могут быть визуализированы по спектрам (каналам детекции) Blue, Green, Yellow, Red, Purple. Размерный стандарт AMGene ILS Orange 600 детектируется в канале Orange одновременно с исследуемыми образцами.

Набор может быть использован для прямой амплификации (Direct-PCR) только при работе с биологическими материала с карт-носителей и образцами буккального эпителия.

Набор рассчитан на проведение 200 реакций в объеме реакционной смеси 25 мкл.

## 2. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят инструкция по применению, паспорт-вкладыш (паспорт ОТК) и следующие компоненты:

1. Базовая комплектация:
   – реакционная смесь, 2 пробирки, общий объем (2000,0±5,0) мкл;
   – смесь праймеров, 2 пробирки, общий объем (1000,0±5,0) мкл;
   – контрольная ДНК, 1 пробирка, (60,0±3,0) мкл;
   – вода для амплификации, 2 пробирки, общий объем (2000,0±5,0) мкл;
   – размерный стандарт, 1 пробирка, (500,0±5,0) мкл;
   – аллельная лестница, 1 пробирка, (50,0±3,0) мкл.
2. Расширенная комплектация:
   – реакционная смесь, 2 пробирки, общий объем (2000,0±5,0) мкл;
   – смесь праймеров, 2 пробирки, общий объем (1000,0±5,0) мкл;
   – контрольная ДНК, 1 пробирка, (60,0±3,0) мкл;
   – вода для амплификации, 2 пробирки, общий объем (2000,0±5,0) мкл;
   – размерный стандарт, 1 пробирка, (500,0±5,0) мкл;






Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– аллельная лестница, 1 пробирка, (50,0±3,0) мкл;
– матричный стандарт, 1 пробирка, (20,0±3,0) мкл.

## 3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать спецодежду (халаты) по ГОСТ 12.4.131 или ГОСТ 12.4.132 и одноразовые резиновые перчатки по ГОСТ 3-88.

3.2 Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны и периодичность контроля должны соответствовать требованиям гигиенического норматива «Показатели безопасности и безвредности микроорганизмов-продуцентов, микробных препаратов и их компонентов, вредных веществ в воздухе рабочей зоны и на кожных покровах работающих», утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 25.01.2021 г. № 37.

3.3 Утилизация отработанного набора должна проводиться в соответствии с законом Республики Беларусь от 20 июля 2007 г. «Об обращениях с отходами».

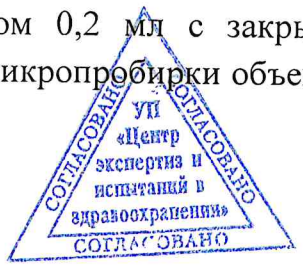
3.4 Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с образцами ДНК.

3.5 Избегать контакта с кожей и слизистыми оболочками. При контакте, промыть большим количеством проточной воды.

## 4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для использования набора необходимо:

1. Амплификатор;
2. ПЦР-бокс;
3. Генетический анализатор, в комплекте с компьютером и программным обеспечением, позволяющим проводить анализ STR-локусов (ABI 3130/3130xl, ABI 3500/3500xl, Нанофор 05 или аналоги);
4. Центрифуга-вортекс;
5. Набор полуавтоматических пипеток переменного объема, позволяющих отбирать объемы жидкостей 0,1-2 мкл; 0,5-10 мкл; 2-20 мкл; 10-100 мкл и 50-200 мкл, аттестованных по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность, не более 3 %);
6. 96-луночный планшет (совместимый с используемым генетическим анализатором);
7. Септа для 96-луночного планшета;
8. Полипропиленовые пробирки объемом 0,2 мл с закрывающимися плоскими крышками или стрипованные по 8 шт. микропробирки объемом 0,2 мл с крышками;






Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Полипропиленовые пробирки объемом 0,5 или 1,5 мл с закрывающимися крышками;

10. Наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл и 200 мкл;

11. Штативы с хладагентом для микропробирок;

12. Холодильник, отрегулированный на температуру от плюс 2 до плюс 8 °С и морозильная камера – не менее минус 20 °С;

13. Морозильная камера, отрегулированная на температуру от минус 18 до минус 24 °С.

Реагенты и расходные материалы для капиллярного электрофореза:

1. Блок капилляров длиной 50 см (или 36 см) для генетического анализатора;

2. Формамид-СЕ («АМГен Бел», Республика Беларусь) или аналог;

3. Полимер «Восток-7» («АМГен Бел», Республика Беларусь) или аналог; набор валидирован также для использования полимера «Восток-4» («АМГен Бел», Республика Беларусь) или их аналогов;

4. Буферы для генетических анализаторов «БУФЕР-СЕ», катодный, анодный («АМГен Бел», Республика Беларусь) или аналог.

5. Отдельные халаты и одноразовые нитриловые перчатки без талька.

## 5. ПОРЯДОК ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАБОРА

5.1 Перед началом работы разморозить компоненты набора при комнатной температуре (при необходимости), все дальнейшие процедуры приготовления реакционной смеси, положительного и отрицательного контролей, проводить при комнатной температуре, тщательно перемешать на вортексе и сбросить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием. Определить суммарное количество реакций, которое должно включать в себя количество исследуемых образцов, положительный и отрицательный контроли.

Отбирают 8 микропробирок вместимостью 0,2 мл, маркируют их от «К-1» до «К-7», «ОК» для отрицательного контроля.

5.2 Приготовление реакционной смеси для ПЦР из расчета на одну реакцию, таблица 1:

Таблица 1 – Состав и пропорции реакционной смеси

| **Компоненты** | **Объем на 1 реакцию(25 мкл)** |
|---|---|
| Геномная ДНК человека | не менее 1 нг |
| Реакционная смесь | 10,0 мкл |
| Смесь праймеров | 5,0 мкл |



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

| | |
|---|---|
| Вода для амплификации | Довести объем реакции до 25,0 мкл |

При проведении прямой амплификации (Direct-PCR) образцы буккального эпителия или биологический материал с карт-носителей (препараты ДНК из образцов буккального эпителия могут быть получены с использованием наборов реагентов для проведения экспресс лизиса) добавляются в объеме 2 мкл на одну реакцию, объем реакционной смеси доводится до 25 мкл водой для амплификации из набора.

5.3 Для постановки положительного контроля тщательно перемешать на вортексе контрольнуюДНК (2 нг/мкл) из набора, внести в реакцию 0,2 – 0,5 нг ДНК, при постановке прямой амплификации внести в контрольную реакцию 2-4 нг контрольной ДНК.

5.4 Для постановки отрицательного контроля внести в реакционную смесь необходимый объем воды для амплификации из набора вместо ДНК.

5.5 Проведение контроля

5.5.1 Внести в промаркированные микропробирки готовую реакционную смесь, используя наконечник с аэрозольным барьером. Перемешать пипетированием.

5.5.2 Пробирки перемешать и осадить на центрифуге-вортексе.

5.5.3 Поместить пробирки в амплификатор. Запрограммировать прибор задав следующие параметры эксперимента:

| | | |
|---|---|---|
| денатурация | 95 °С, 5 мин | 1 цикл |
| элонгация/удлинение | 95 °С, 10 сек<br>59 °С, 120 сек | 17-25 циклов*<br>или<br>30 циклов** |
| финальная элонгация | 60 °С, 10 мин | 1 цикл |
| хранение | 4 °С | ∞ |

* Оптимальное количество циклов при проведении прямой амплификации

**Оптимальное количество циклов для работы с различными образцами (зависимость от количества ДНК в исследуемом образце) может быть откорректировано пользователем, допускается увеличение количества циклов до 32.

Анализ продуктов амплификации проводят на генетическом анализаторе с использованием специализированного программного обеспечения.

5.5.4 Спектральная калибровка

Для проведения спектральной калибровки генетического анализатора, используется набор флуоресцентных красителей «Матричный стандарт AMGene-MS» (ООО «АМГен Бел», Республика Беларусь, кат. 375.17.078). Перед процедурой спектральной калибровки необходимо выполнить пространственную калибровку.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Эта процедура описана в «Руководстве пользователя» к используемому генетическому анализатору.

Разморозить матричный стандарт, подготовить свежий формамид высокой степени очистки и приготовить смесь в соотношении 198 мкл формамида/2 мкл матричного стандарта (при низкой интенсивности сигнала полученных пиков возможно увеличение матричного стандарта до 4 мкл).

Для моделей генетических анализаторов с 24 капиллярами объемы используемых компонентов должны быть увеличены в 3 раза.

Приготовленную смесь формамида и матричного стандарта внести по 12 мкл в лунку. Провести денатурацию при 95 °С в течении 3 мин с последующим охлаждением до 4 °С.

В программе Data Collection создать новый Dye Set, согласно параметрам в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры спектральной калибровки

| Параметр | Значение |
|---|---|
| Dye Set Name | AMGene-MS |
| Chemistry | Matrix Standard |
| Dye Set Template | J6 Template |
| Matrix Condition Number Upper | 20 |
| Locate Start Point (After Scan) | 800 |
| Locate Start Point (Before Scan) | 5000 |
| Limit Scans To | 20000 |
| Sensitivity | 0,4 |
| Minimum Quality Score | 0.95 |

Выполнить цикл спектральной калибровки. Когда спектральная калибровка будет успешно завершена, результаты отобразятся в строке «Overall» в зеленом цвете.

Если результаты в строке «Overall» отобразились в красном цвете, см. раздел «Поиск и устранение неполадок при спектральной калибровке» «Руководства пользователя» к генетическому анализатору.

5.5.5 Добавление размерного стандарта

На вкладке «Library» выбрать «Size Standards» - «Create». Присвоить новому размерному стандарту наименование «AMGene ILS Orange 600». Выбрать значение «Orange» для «Dye Color». Указать размеры фрагментов для размерного стандарта: 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, сохранить вновь созданный протокол. В

СОГЛАСОВАНО СОГЛАСОВАНО «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» СОГЛАСОВАНО



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

качестве альтернативы можно использовать ранее созданный «Size Standard», внести в него корректировки и сохранить внесенные изменения.

5.5.6 Создание протокола анализа

На вкладке «Library» перейти в раздел «Instrument Protocols», создать новый протокол с учетом типа анализа (Fragment или HID), длины капилляра (50 или 36 см), типа полимера (POP7 или POP4), спектральной калибровки (AMGene-MS), ввести «Protocol Name» (IP AMGene 23 ID STR-plex).

Создайте протокол анализа на основе матрицы спектральной калибровки в соответствии со специализированным пользовательским протоколом для данной модели анализатора. Используйте параметры капиллярного электрофореза, приведенные в таблице 3:

Таблица 3 – Параметры капиллярного электрофореза

| Параметр | Значение | Параметр | Значение |
|---|---|---|---|
| OvenTemperature | 60 | VoltageNumberofSteps | 20 |
| PreRun Voltage | 15 | Voltage Step Interval | 15 |
| PreRun Time | 180 | Data Delay Time | 1 |
| Injection Voltage | 1.2 | RunVoltage | 15,0 |
| InjectionTime* | 15 | RunTime | 1800 |

* Время инжекции может быть изменено для увеличения или уменьшения высоты пика.

Сохранить созданный протокол.

На вкладке «Library» перейти в раздел «QS Protocol» - «Create», в поле «Protocol Name» ввести имя (QS AMGene 23 ID STR-plex), выбрать из пункта меню «Matrix Standard» («AMGene-MS»), задать параметры «Sizing Range» - 60-600, «Analysis Range» - 200-1000000. Сохранить внесенные изменения.

Для завершения протокола создать метод анализа. На вкладке «Library» выбрать «Assays» - «Create». В появившемся окне указать параметры нового «Assay»: «Name» (AMGene ID 23 STR-plex), «Color» (Magenta), «Instrument Protocol» (IP AMGene 23 ID STR-plex), «QC Protocol» (QS AMGene 23 ID STR-plex). Сохраните внесенные изменения.

5.5.7 Подготовка проб к фрагментному анализу

В расчете на одну лунку 96-луночного планшета внести по 10,0 мкл смеси формамид (9,0 мкл) / размерный стандарт (1,0 мкл) и 1,0 мкл продукта ПЦР (одной из промаркированных пробирок) или 1 мкл аллельной лестницы. Планшет закрыть септой и поместить в амплификатор. Провести тепловую денатурацию при 95 °С 5 минут с последующим охлаждением от 4 до 10 °С.

5.5.8 Ввод параметров для анализируемого 96-луночного планшета

СОГЛАСОВАНО
УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»
СОГЛАСОВАНО



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

При описании анализируемого планшета в программе генетического анализатора «Data Collection Software» ввести информацию: «Assay», «Result group». Анализируемый планшет поместить в генетический анализатор и запустить выполнение фрагментного анализа согласно «Руководству пользователя» прибора.

5.6 Анализ результатов

5.6.1 Настройка маркерных панелей

Полученные данные обрабатывают с помощью программного обеспечения GeneMapper ID-X или GeneMapper 4 и импортируемых файлов с панелью маркеров и набором бинов, которые предоставляются разработчиком набора.

Информация о характеристиках маркерной панели и генотипе контрольной ДНК приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Параметры маркерной панели исследуемых локусов

| n/n | Marker Name | Dye Color | Состав аллельной лестницы | Аллели контрольной ДНК |
|---|---|---|---|---|
| 1 | D3S1358 | Blue | 11-20 | 15/16 |
| 2 | D13S317 | Blue | 6-15 | 13/13 |
| 3 | D1S1656 | Blue | 11-19.3 | 14/14 |
| 4 | CSF1PO | Blue | 7-15 | 10/12 |
| 5 | D2S441 | Green | 7-16 | 11/12 |
| 6 | D5S818 | Green | 7-16 | 10/13 |
| 7 | TH01 | Green | 4-13.3 | 6/7 |
| 8 | FGA | Green | 13-50.2 | 19/27 |
| 9 | Амелогенин | Yellow | X, Y | X, Y |
| 10 | Y indel | Yellow | 1,2 | 2 |
| 11 | D8S1179 | Yellow | 8-19 | 14/15 |
| 12 | D21S11 | Yellow | 25-37 | 28/31 |
| 13 | D16S539 | Yellow | 6-15 | 8/11 |
| 14 | TPOX | Yellow | 6-14 | 8/13 |
| 15 | D10S1248 | Yellow | 8-18 | 12/13 |
| 16 | D22S1045 | Red | 10-19 | 15/18 |
| 17 | D19S433 | Red | 9-18.2 | 14/14.2 |
| 18 | D7S820 | Red | 6-15 | 10/10 |
| 19 | D18S51 | Red | 9-28 | 17/17 |
| 20 | DYS391 | Purple | 5-15 | 10/10 |
| 21 | vWA | Purple | 12-22 | 17/19 |
| 22 | D2S1338 | Purple | 13-28 | 22/22 |
| 23 | D12S391 | Purple | 15-28 | 18/19 |

Для всех стандартизированных положительных образцов ДНК в каждом из анализируемых локусов должны детектироваться один или два (в случае гетерозиготы) фрагмента с массой, соответствующей одному или двум (в случае

СОГЛАСОВАНО ЗАО «Центр испытаний в сфере» СОГЛАСОВАНО



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

гетерозиготы) значениям, приведенным в таблице 4 для каждого конкретного локуса.

В образце, помеченном, как ОК, должны отсутствовать какие-либо фрагменты из таблицы 4 с уровнем флуоресценции выше установленного порога (по умолчанию, это 50 RFU). При наличии вышеуказанных фрагментов, следует заново изготовить компоненты набора и с каждым из новых компонентов повторить анализ с ОК, чтобы забраковать тот компонент набора, который оказался контаминирован.

## 6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

1. Все компоненты набора реагентов следует хранить при температуре от минус 18 до минус 24 °С. Не рекомендуется использовать для хранения данных реагентов морозильную камеру типа «No Frost». После первого использования допускается хранение компонентов набора при температуре от 4 до 10 °Св течение 3 месяцев. Следует избегать частых циклов оттаивание-замораживание.

Комплекты реагентов для амплификации и проведения электрофореза, после получения набора, следует хранить раздельно.

2. Не смешивать компоненты набора из разных партий.

3. Для отбора и добавления компонентов набора рекомендуется использовать автоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованными на точность по значению средней дозы и сходимость результатов пипетирования.

4. Во избежание контаминации рекомендуется вносить компоненты набора наконечниками с аэрозольным барьером.

5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

6. При несоблюдении указаний по применению, производитель не несёт ответственности за результаты анализа.

7. Срок годности набора 12 месяцев.






Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru