



# Набор реагентов для мультиплексного анализа 18-ти STR-маркеров хромосомы Y человека

## Инструкция пользователя

### Оглавление

<b>1.</b>	<b>ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ</b>	<b>2</b>
1.1	Описание продукта	2
1.2	Информация для заказа набора CORDIS Y и его компонентов	4
1.3	Компоненты набора и состав (на примере кат. ном. CY-108S)	4
1.4	Условия хранения	5
1.5	Основные характеристики набора	6
1.6	Сопутствующие материалы	6
<b>2.</b>	<b>РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ</b>	<b>7</b>
2.1	Контрольная ДНК	7
2.2	Размерный стандарт S550	7
2.3	Аллельный лэддер	7
<b>3.</b>	<b>ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ</b>	<b>8</b>
3.1	Постановка реакции	8
3.2	Условия амплификации	8
<b>4.</b>	<b>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130/3130XL</b>	<b>10</b>
4.1	Создание матрикса / спектральная калибровка	10
4.2	Условия капиллярного электрофореза.	12
4.3	Создание Instrument Protocol	13
4.4	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	13
4.5	Запуск прибора	14
4.6	Оптимизация интенсивности сигналов	15
<b>5.</b>	<b>АНАЛИЗ ДАННЫХ</b>	<b>16</b>
5.1	Стандарт длины S550	16
5.2	Амплификация контрольной ДНК	17
<b>6.</b>	<b>ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ</b>	<b>18</b>

## 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

### 1.1 Описание продукта

CO<sub>r</sub>DIS Y – набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 18-ти локусов хромосомы Y, содержащих короткие tandemные повторы (STR-локусы) в геномной ДНК человека. Из 18-ти анализируемых STR-локусов 9 составляют так называемый «минимальный гаплотип», определенный европейским сообществом судебных генетиков для стандартизации исследований Y хромосомы: DYS19, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, и DYS385 a/b, 2 локуса: DYS438 и DYS439 рекомендованы SWGDAM в качестве дополнительных маркеров для анализа «расширенного гаплотипа», и 7 высокополиморфных локусов для увеличения дискриминирующего потенциала: DYS437, DYS447, DYS576, DYS449, DYS456, DYS448 и DYS635. Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 20-ти локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов < 400 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с лазериндуцированной флуоресцентной детекцией. В наборе используется пять флуоресцентных красителей, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременной детекции в разных каналах флуоресценции. Праймеры мечены четырьмя флуоресцентными красителями детектируемыми в каналах *Blue*, *Green*, *Yellow*, *Red*. Стандарт длины S550 мечен пятым, флуоресцентным красителем и детектируется в отдельном канале *Orange* одновременно с продуктами ПЦР.

Для получения полного STR-профиля образца достаточно 0,2 нанограмм недеградированной ДНК. Оптимальное количество – 0,5 нанограмм.

Реакционная смесь в наборе аликвотирована в реакционных стрипованных пробирках 0,2 мл и поставляется в лиофилизированном виде, благодаря чему реакционные смеси могут храниться при комнатной температуре не менее 18 месяцев без потери чувствительности. Компоненты реакции активируются добавлением определенного объема раствора активатора в каждую пробирку. Общий объем реакции 25 мкл. Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 20 мкл. Благодаря высокой устойчивости реакционной смеси к действию ингибиторов, большой объем препарата ДНК не мешает успешной амплификации.

Набор CO<sub>r</sub>DIS Y может использоваться для идентификации личности в смешанных объектах, даже в тех случаях, когда преобладающим компонентом смеси является женская ДНК, а так же для анализа родства по мужской линии.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах: GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, MJ Research PTC-100, BioRAD MyCycler, Biometra TPersonal, Eppendorf Mastercycler. Анализ ПЦР-продуктов может проводиться с использованием генетических анализаторов ABI PRISM® 310/3100/3100-

Avant/3130/3130XL/3500/3500XL (Applied Biosystems), MegaBace 1000 (GE Healthcare Life Sciences), Нанофор 5 (Институт Аналитического Приборостроения РАН).

**Таблица 1. Описание STR-локусов CO<sub>r</sub>DIS Y**

Маркер	Реф. номер GenBank	Реф. аллель GenBank	Диапазон аллелей	Структура единицы повтора реф. аллеля
DYS391	AC011302	11	5-16	[TCTA] <sub>11</sub>
DYS389I	AC004617	12	8-17	[TCTG] <sub>3</sub> [TCTA] <sub>9</sub>
DYS19	AC017019	15	9-19	[TAGA] <sub>3</sub> TAGG [TAGA] <sub>12</sub>
DYS437	AC002992	16	8-18	[TCTA] <sub>10</sub> [TCTG] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>4</sub>
DYS389II	AC004617	29	23-35	[TCTG] <sub>5</sub> [TCTA] <sub>12</sub> [TCTG] <sub>3</sub> [TCTA] <sub>9</sub>
DYS393	AC006152	12	7-18	[AGAT] <sub>12</sub>
DYS392	AC011745	13	4-20	[TAT] <sub>13</sub>
DYS447	AC005820	23	22-29	[TAATA] <sub>6</sub> [TAAAA] <sub>1</sub> [TAATA] <sub>9</sub> [TAAAA] <sub>1</sub> [TAATA] <sub>6</sub>
DYS576	AC010104	17	13-21	[AAAG] <sub>17</sub>
DYS438	AC002531	10	7-18	[TTTTTC] <sub>10</sub>
DYS390	AC011289	24	17-29	[TCTG] <sub>8</sub> [TCTA] <sub>11</sub> [TCTG] <sub>1</sub> [TCTA] <sub>4</sub>
DYS449	AC051663	15	24-37	[TTTC] <sub>15</sub>
DYS448	AC025227	22	17-28	[AGAGAT] <sub>13</sub> N <sub>42</sub> [AGAGAT] <sub>9</sub>
DYS456	AC010106.2	15	12-18	[AGAT] <sub>15</sub>
DYS439	AC002992	13	5-19	[GATA] <sub>13</sub>
DYS385	AC022486	11	6-28	[GAAA] <sub>11</sub>
DYS635	AC004772	23	17-27	[TCTA] <sub>4</sub> [TGTA] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>2</sub> [TGTA] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>2</sub> [TGTA] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>9</sub>

**Таблица 1** Сводная информация о STR-локусах набора CO<sub>r</sub>DIS Y. Структура единицы повтора приводится в соответствии с рекомендациями Международного Общества Судебных Генетиков (International Society for Forensic Genetics - ISFG) [Bär et al, 1997].

## 1.2 Информация для заказа набора CO<sub>2</sub>DIS Y и его компонентов

Набор CO<sub>2</sub>DIS Y может поставляться в пробирках, объединенных по 8 штук в стрипы с отдельно прикрепленными крышками, либо в 96-луночных планшетах:

- Стрипы 8 x 0.2 мкл, пробирки с отдельноприкрепленными крышками

Название	Реакций в наборе	Каталожный номер
CO <sub>2</sub> DIS Y	12 x 8 пробирок (96 реакций)	CY-108S

- Планшеты 96 x 0,2 мл (перфорированные планшеты, могут быть разделены на 4 части по 24 реакции)

Название	Реакций в наборе	Каталожный номер
CO <sub>2</sub> DIS Y	1 x 96 пробирок (96 реакций)	CY-196P

## 1.3 Компоненты набора и состав (на примере кат. ном. CY-108S)

1. Стрипы с реакционными смесями 8 x 0.2 мл	12 стрипов
2. Раствор активатора (голубая крышка)	600 мкл
3. Деионизованная вода (белая крышка)	2.0 мл
4. Контрольная ДНК МК1 (лиоф., зеленая крышка)	1 пробирка (40 реакций)
5. Стандарт длины S550, (лиоф., желтая крышка)	1 пробирка (120 нанесений)
6. Аллельная лестница, (лиоф., красная крышка)	1 пробирка (20 нанесений)
7. Планшет 96-луночный	1 шт.

**Стрипы с реакционными смесями** представляют собой реакционные пробирки объемом 0.2 мл, объединенные в стрипы по 8 шт и предназначены для проведения в них полимеразной цепной реакции. На дне пробирок содержатся все лиофилизированные компоненты полимеразной цепной реакции включая Taq-полимеразу, смесь дНТФ, реакционный буфер, праймерную смесь. Благодаря флуоресцентно-меченым праймерам лиофилизированная сухая стекловидная реакционная смесь на дне пробирок имеет розовый цвет. Наборы могут также комплектоваться реакционными смесями, аликвотированными в реакционных 96-луночных планшетах (кат ном. CY-196P)

**Раствор активатора** используется для разведения лиофилизированной реакционной смеси. Содержит буферный раствор и ионы магния Mg<sup>2+</sup> в качестве активатора полимеразной цепной реакции.

**Деионизованная вода** предназначена для разведения компонентов набора и доведения реакций до рабочего объема.

**Контрольная ДНК МК1** представляет собой 20 нг высокомолекулярной лиофилизированной геномной ДНК мужчины с известным генотипом по всем исследуемым локусам (Таб. 2, Рис. 2). Предназначена для контроля этапов амплификации, электрофореза и анализа данных. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует разведения водой (п. 2.1).

**Стандарт длины S550** представляет собой лиофилизированную смесь флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК разной длины, меченых спектральным аналогом LIZ, детектируемым в канале *Orange*. Стандарт длины S550 содержит 24 фрагмента ДНК разной длины (н.п.): 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450, 500 и 550. Стандарт S550 используется на этапе капиллярного электрофореза, вносится в каждый капилляр одновременно с исследуемым образцом и служит опорным внутренним стандартом для построения кривой подвижности амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Благодаря высокой плотности фрагментов стандарта S550 обеспечивается высокая точность и воспроизводимость определения длины амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Перед использованием требует добавления воды (п. 2.2).

**Аллельная лестница** представляет собой лиофилизированную смесь флуоресцентно-меченных амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующих всем аллельным вариантам исследуемых локусов, встречающимся с частотой более 1%. Аллельная лестница используется на этапе капиллярного электрофореза, анализируется параллельно с каждой серией образцов для идентификации аллельных вариантов исследуемых локусов. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует добавления воды (п. 2.3). Аллельный лэддер содержит ПЦР-продукты и при несоблюдении мер предосторожности может быть источником контаминации остальных реагентов. Сразу после получения набора рекомендуется извлечь аллельный лэддер из общей упаковки и хранить отдельно от остальных компонентов в темноте в зоне для работы с ПЦР-продуктами.

## 1.4 Условия хранения

Все компоненты за исключением раствора активатора и деионизированной воды, поставляются в сухом виде. В связи с этим при транспортировке не требуется соблюдение специального температурного режима. Флуоресцентно меченные праймеры, размерный стандарт S550 и аллельный лэддер чувствительны к воздействию света и должны храниться в темном месте. Пользователи могут хранить наборы при комнатной температуре в течение нескольких месяцев без потери чувствительности.

Контрольная ДНК, аллельный лэддер и размерный стандарт после разведения лиофилизированных компонентов водой, должны храниться при 2 - 8°C в течение месяца. Для более длительного хранения рекомендуется заморозка при -20°C.

Сразу после получения набора рекомендуется извлечь аллельный лэддер из общей упаковки и хранить отдельно от остальных компонентов в темноте в зоне для работы с ПЦР-продуктами. После разведения водой, аллельный лэддер рекомендуется хранить при температуре 2–8°C. Для длительного хранения рекомендуется заморозка при -20°C.

## 1.5 Основные характеристики набора

Количество одновременно анализируемых маркеров – 18;

Список одновременно анализируемых локусов:

DYS391, DYS389I, DYS19, DYS437, DYS389II, DYS393, DYS392, DYS447, DYS576, DYS438, DYS390, DYS449, DYS448, DYS456, DYS439, DYS385, DYS635, Количество

флуоресцентных меток, используемых в наборе – 5;

Оптимальное количество вносимой ДНК: 0,5 нг

Предел чувствительности: < 50 пг;

### Гарантии качества

Высокое качество каждого компонента набора проверено и контролируется в процессе производства. Каждый выпущенный лот лиофилизированных реагентов регулярно проверяется на соответствие заявленным характеристикам в течение 18 месяцев. В случае возникновения вопросов относительно качества набора CO<sub>r</sub>DIS Y, просим незамедлительно связаться с ООО “ГОРДИЗ”. Контактная информация указана в разделе б.

## 1.6 Сопутствующие материалы

**Необходимые материалы, не входящие в набор. Поставляются ООО “ГОРДИЗ” по запросу:**

Матриксный стандарт MXS5+ для ABI 3130 и ABI 3130xl (ООО “ГОРДИЗ”).

Бины и панели для GeneMapper (ООО “ГОРДИЗ”).

### Материалы, поставляемые другими фирмами

Реагент	Производитель	Каталожный номер
Буфер TAPS	ЗАО «СИНТОЛ»	ТАПС
Полимер ПДМА6	ЗАО «СИНТОЛ»	ПДМА-6
Ni-Di™ Formamide	Applied Biosystems	(P/N 4311320)
10 x Genetic Analyzer Buffer	Applied Biosystems	(P/N 402824)
Polymer (POP-4)	Applied Biosystems	(P/N 402838)

## 2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ

### 2.1 Контрольная ДНК

Добавить 40 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором в пробирку с сухой контрольной ДНК (пробирка с зеленой крышкой). Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Для проведения ПЦР необходимо добавить 1 мкл контрольной ДНК в реакционную пробирку. Данный объем будет соответствовать 500 пг геномной ДНК. После разведения, контрольную ДНК необходимо хранить при температуре 2 – 8 °С в течение месяца. Для более длительного хранения рекомендуется хранить в замороженном виде. Следует избегать многократного размораживания.

### 2.2 Размерный стандарт S550

Перед использованием добавить 120 мкл деионизированной воды в пробирку с сухим размерным стандартом S550 (пробирка с желтой крышкой). Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием.

После разведения, контрольную ДНК необходимо хранить при температуре 2 – 8 °С в течение месяца. Для более длительного хранения рекомендуется хранить в замороженном виде. Следует избегать многократного размораживания.

Для проведения капиллярного электрофореза добавить 1 мкл стандарта S550 в каждую лунку планшета, содержащую формамид и ПЦР продукт.

### 2.3 Аллельный лэддер

Сразу после получения набора, пробирку с аллельным лэддером необходимо извлечь из коробки и хранить отдельно в зоне для работы с ПЦР-продуктами в темном месте.

Для получения рабочего раствора добавить в пробирку с сухим аллельным лэддером (красная крышка) 20 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки центрифугированием в течение нескольких секунд. После разведения аллельный лэддер необходимо хранить в темноте при температуре 2 - 8 °С. Для длительного хранения (> 3 месяцев) рекомендуется хранить раствор в замороженном виде. Следует избегать многократной разморозки. Для проведения капиллярного электрофореза необходимо добавить 1 мкл лэддера в смесь формамида и размерного стандарта (см. п. 4.4).

### 3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

#### 3.1 Постановка реакции

В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Активатора. Затем внести до 20 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0,2 – 2 нг. Оптимальное количество вносимой ДНК – 0,5 нг. Вносимый объем ДНК зависит от ее концентрации. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет **20 мкл**. При необходимости довести общий объем реакции до 25 мкл деионизированной водой, поставляемой в составе набора.

<u>Компоненты набора</u>	<u>Объем на 1 реакцию</u>
Раствор активатора	5 мкл
Геномная ДНК (0.2 – 2 нг)	до 20 мкл
Деионизованная вода, до конечного объема	25 мкл

Необходимо учитывать, что в некоторых случаях при добавлении ДНК в объеме более 10 мкл возможно внесение избытка ингибирующих веществ в реакцию, что может приводить к снижению чувствительности. Тем не менее, набор CO<sub>2</sub>DIS Y обладает высокой устойчивостью к ингибиторам. В связи с этим, как правило, большие объемы раствора ДНК не вызывают трудностей. При разведении геномной ДНК водой важно помнить, что в деионизованной воде происходит постоянный гидролиз ДНК. Для длительного хранения рекомендуется разведение ДНК в буферах (рН > 7), содержащих небольшое количество ЭДТА (например, ТЕ с 0,1 мМ ЭДТА). Высокая концентрация ЭДТА в растворе ДНК может быть причиной снижения эффективности реакции вследствие хелатирования ионов магния.

После внесения всех компонентов, реакционную смесь необходимо тщательно перемешать до гомогенного состояния 5-8 кратным пипетированием, либо используя вортекс. При необходимости, собрать раствор на дне пробирки коротким центрифугированием. Тщательное перемешивание необходимо для максимальной эффективности реакции.

С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один **положительный контроль** (1 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (деионизованная вода вместо ДНК).

#### 3.2 Условия амплификации

Приведенные ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных параметров. Важно соблюдение скорости нагрева **0,3°C/сек.** на этапе повышения с температуры с 60°C до 72°C. В связи с высокой сложностью амплификации с участием 18 пар праймеров **данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции.**



## Параметры ПЦР:

94°C 3 мин

98°C 30 сек

60°C\* 120 сек 4 цикла

72°C 90 сек

94°C 30 сек

60°C\* 120 сек 6 циклов

72°C 90 сек

90°C 30 сек

60°C 120 сек 20 циклов

72°C\* 75 сек

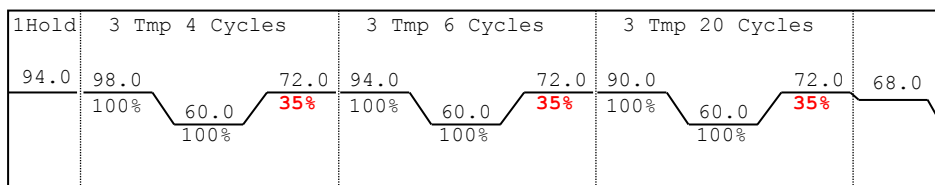
68°C 30 мин

15°C ∞

\* Рекомендуемая скорость нагрева с 60°C до 72°C - не более 0,3°C/1 сек.

В случае, если используемая модель амплификатора не позволяет точно устанавливать скорость нагрева, рекомендуется воспользоваться секундомером для подбора рекомендуемой скорости.

Например, в амплификаторах GeneAmp 9700 не предусмотрена возможность точного программирования скорости изменения температуры, но они позволяют ограничить скорость нагрева в процентном отношении. В приведенном ниже примере показаны подобранные значения скорости нагрева в процентном выражении для амплификатора GeneAmp 9700 с алюминиевым блоком в режиме эмуляции GeneAmp 9600.



При работе с низкокопийными количествами ДНК (< 0,1 нг ДНК) можно повысить чувствительность реакции добавив 2-4 дополнительных цикла ПЦР. Не рекомендуется превышать 34 цикла. В этом случае возрастает опасность ошибки вследствие выпадения аллелей и дисбаланса гетерозигот.

После завершения программы ПЦР, амплифицированные продукты можно хранить неделю при 4°C – 8°C в защищенном от света месте. В случае, если амплифицированные продукты необходимо хранить более недели, рекомендуется заморозка при -20°C.

#### 4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130/3130XL

При работе с генетическим анализатором ABI PRISM, и последующем анализе флуоресцентных профилей в программе GeneMapper™, необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

Для корректной визуализации пяти флуоресцентных меток CO<sub>r</sub>DIS Y необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “any5dyes” с использованием матрикс-стандарта MXS5+.

##### 4.1 Создание матрикса / спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации CO<sub>r</sub>DIS Y на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным матрикс-стандартом MXS5+ (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру: MXS5+). Матрикс-стандарт содержит смесь 5-ти фрагментов разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями. Эти красители использованы в наборе для мечения ПЦП-продуктов и размерного стандарта S550.

Для приготовления рабочего раствора матрикс-стандарта MXS5+ добавить 50 мкл деионизованной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный MXS5+ (пробирка с бесцветной крышкой) и инкубировать при комнатной температуре 2 мин. Затем тщательно перемешать раствор на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Готовый раствор можно хранить в темном месте при температуре 2 °С – 8 °С до 2 недель. Для более длительного хранения раствор следует заморозить. Следует избегать повторного размораживания.

##### Подготовка матрикс-стандарта для калибровки (ABI 3130 /4 капилляра)

Ni-Di™ формамид	40 мкл
Раствор MXS5+	4 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01-D01 96-луночного планшета. При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

##### Подготовка матрикс-стандарта для калибровки (ABI 3130XL/16 капилляров)

Ni-Di™ формамид	160 мкл
Раствор MXS5+	16 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01- H02 96-луночного планшета. При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

## Спектральная калибровка

### Шаг А – Создание Instrument Protocol для спектральной калибровки

Открыть **Protocol Manager** в программе **Data Collection Software**

Зайти в вкладку **Instrument Protocol** и выбрать **New** чтобы открыть **Protocol Editor**

Ввести следующие параметры в окне **Protocol Editor (Instrument Protocol)**:

Параметр	Значение
Name	например, Spectral36_POP4_MXS5
Type	SPECTRAL
Dye Set	any5dye
Polymer	POP4
Array Length	36
Chemistry	Matrix Standard
Run Module	Spect36_POP4_1

Выбрать **ОК** и закрыть **Protocol Editor**

### Шаг Б – Создание планшета

Перейти в **Plate Manager** программы **Data Collection Software** выбрать кнопку **New**. Откроется окно **Plate Dialog**.

**Ввести следующие параметры в диалоговом окне New Plate:**

Name	например, Spectral_any5_MXS
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-Well

Выбрать **ОК**. Появится новая таблица **Plate Editor**

Ввести в позиции A01:

Sample Name	например, MXS5
Priority	например, 100
Instrument Protocol	Spectral36_POP4_MXS5 (см. выше)

Выделить ячейку A01 целиком. В меню **Edit** выбрать команду **Fill Down Special**. Программа заполнит введенными значениями соответствующее количество ячеек для одной загрузки капилляров. Например, от A01 до A04 (**ABI 3130 / 4 капилляра**) или от A01 до H02 (**ABI 3130XL / 16 капилляров**).

Выбрать **ОК** чтобы закончить создание планшета и выйти из **Plate Editor**.

## Шаг С – Проведение спектральной калибровки

Перейти во вкладку **Run Scheduler – Plate View** и выбрать **Find All**. Выбрать заданное название созданного планшета (например, Spectral\_anu5\_MXS). Связать выбранное название с установленным в прибор планшетом. Запустить прибор.

## Шаг D – Оценка результатов спектральной калибровки

После завершения работы прибора проверить статус каждого капилляра (pass или fail). Открыть **Instrument Status**, перейти во вкладку **Event Log**. В окне **Event Messages** отображается статус всех капилляров. Каждый капилляр должен иметь значение Q-value не ниже **0.95**. Высота пиков должна быть не менее 1.000 rfu, но ниже 5.000 rfu (оптимальный диапазон между 2000 и 4000 rfu).

Дополнительно в окне **Spectral Viewer** можно просмотреть флуоресцентный профиль калибровки для каждого капилляра. Калибровка должна быть успешной минимум для 3 из 4 капилляров (или для 12 из 16 капилляров, соответственно). При использовании MXS5+ в качестве матричного стандарта, в окне профиля калибровки должна отражаться следующая последовательность пиков (слева на право) **синий-зеленый-желтый-красный-оранжевый**.

В случае успешной калибровки рекомендуется ее переименовать, присвоив более удобное название. Для этого нажать кнопку **Rename**, ввести новое название калибровки (например MXS5\_[дата]) и нажать **OK**. Нужно иметь виду, что для каждого набора виртуальных фильтров (**dye set**) последняя калибровка автоматически становится активной. Если вы планируете использовать результаты предыдущих калибровок, их необходимо активировать до запуска прибора.

## 4.2 Условия капиллярного электрофореза.

Перед проведением первого анализа продуктов амплификации CO<sub>r</sub>DIS Y на генетическом анализаторе, необходимо создать соответствующий модуль **Run Module**. Для этого перейти в **Module Manager** программы **Data Collection Software** и нажать кнопку **New**. Откроется окно **Run Module Editor**. Создать модуль со следующими параметрами:

Параметр	Значение
Oven Temperature	60
Poly Fill Volume	4840
Current Stability	5
PreRun Voltage	15
PreRun Time	180
Injection Voltage	3

Injection Time	<b>5</b>
Voltage Number of Steps	40
Voltage Step Interval	15
Data Delay Time	1
Run Voltage	15.0
Run Time	<b>1700</b>

Нажать **Save As** и ввести удобное название для созданного модуля (например, CO<sub>r</sub>DIS Y ). Нажать **OK** и покинуть редактор модуля нажав **Close**.

### 4.3 Создание Instrument Protocol

Перейти в раздел **Protocol Manager** программы **Data Collection Software**. В окне **Instrument Protocol** нажать кнопку **New** чтобы открыть редактор протокола **Protocol Editor**.

Необходимо ввести следующие параметры:

<u>Параметр</u>	<u>Значение</u>
Name	Run36_CO <sub>r</sub> DIS Y
Type	REGULAR
Run Module*	CO <sub>r</sub> DIS Y
Dye Set	Any5Dye

\*значение параметра см. в п. 3.2

Нажать кнопку **OK** чтобы сохранить изменения и выйти из редактора протокола.

### 4.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Для загрузки образцов в прибор необходимо приготовить смесь Hi-Di™ формамида и размерного стандарта S550 (разведенного в соответствии с п. 2.2) в следующем соотношении:

<u>Компонент</u>	<u>Объем на один образец</u>
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1.0 мкл

При расчете объемов компонентов смеси следует учесть, что формамидом должны быть заполнены все лунки, в которых будет происходить инъекция, в том числе и лунки, не содержащие образцы. Как минимум одна лунка при анализе каждой серии образцов должна содержать аллельную лестницу.

После перемешивания добавить по 10 мкл смеси в каждую лунку планшета. Затем внести в лунки по 1 мкл ПЦР-продукта или аллельной лестницы. При необходимости, удалить пузыри со дна лунок планшета коротким центрифугированием. Накрыть планшет резиновым ковриком и загрузить в прибор в соответствии с инструкцией пользователя ABI PRISM® Genetic Analyzer. Набор CO<sub>r</sub>DIS Y не требует температурной денатурации образцов!

## 4.5 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM® проводится в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем. Для получения корректных результатов необходимо создать соответствующую спектральную калибровку (см. раздел 4.1), **Run Module** (см. раздел 4.2), и **Instrument Protocol** (см. раздел 4.3).

### Шаг А Создание планшета

Перед началом анализа необходимо создать **Plate** (планшет), описывающий расположение образцов на планшете и содержащий инструкции для прибора. Перейти в **Plate Manager** программы **Data Collection Software** и нажать кнопку **New**. Появится диалоговое окно **Plate Dialog**. Ввести следующие параметры:

<u>Параметр</u>	<u>Значение</u>
Name	Например CO <sub>r</sub> DIS Y <i>[_data]</i>
Application	выбрать GeneMapper
Plate Type	96-Well

Нажать кнопку **OK**. Появится новая таблица **Plate Editor**.

### Шаг В Заполнение таблицы

<u>Параметр</u>	<u>Значение</u>
Sample Name	Название образца
Priority	обычно 100 (очередность анализа по возрастанию)
Sample Type	Sample / Allelic Ladder / Positive Control / Neg. Control
Size Standard	S450
Panel	CO <sub>r</sub> DIS Y
Analysis Method	Например, GORDIZ
Results Group	Выбрать соответствующий <b>Results Group</b>
Instrument Protocol	Run36_POP4_MXS5

Для удобства в первую очередь лучше ввести все названия образцов. Затем, для первого образца задать все необходимые параметры. Выделить курсором мыши все столбцы. В меню **Edit** выбрать пункт **Fill Down**. Программа

заполнит значениями все выделенные ячейки. После этих действий редактировать столбец Sample Type, выбрав между значениями Allelic Ladder / Positive Control / Negative Control.

### **Шаг С Запуск прибора и информация о статусе прибора**

Перейти в раздел **Run Schedule** и нажать на кнопку **Find All**. Найти в списке название созданного планшета, выделить его и связать нажатием мыши с изображением установленного в приборе планшета. Запустить анализ планшета.

Флуоресцентные профили образцов можно наблюдать в реальном времени в разделе **Capillaries Viewer** или **Cap/Array Viewer**. В случае возникновения системных ошибок, информация о них появится в разделе **Event Log (Error Status)**.

#### **4.6 Оптимизация интенсивности сигналов**

Для повышения интенсивности пиков возможно увеличение времени инъекции до 15 сек и/или увеличение вольтажа до 15 kV.

Возможно усиление сигнала с помощью очистки ПЦР-продукта от праймеров и солей. Количество размерного стандарта в этом случае следует так же уменьшить.

## 5. АНАЛИЗ ДАННЫХ

### 5.1 Стандарт длины S550

Ниже приводится пример электрофореграммы с сигналами фрагментов стандарта длины S550 в канале детекции *Orange*. Обозначения 24 фрагментов ДНК приводятся в соответствии с их размером: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 390, 400, 420, 440, 450, 500, 550

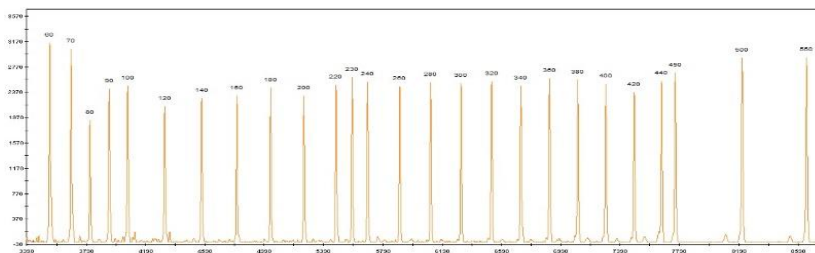


Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550. Размеры фрагментов.



## 5.2 Амплификация контрольной ДНК

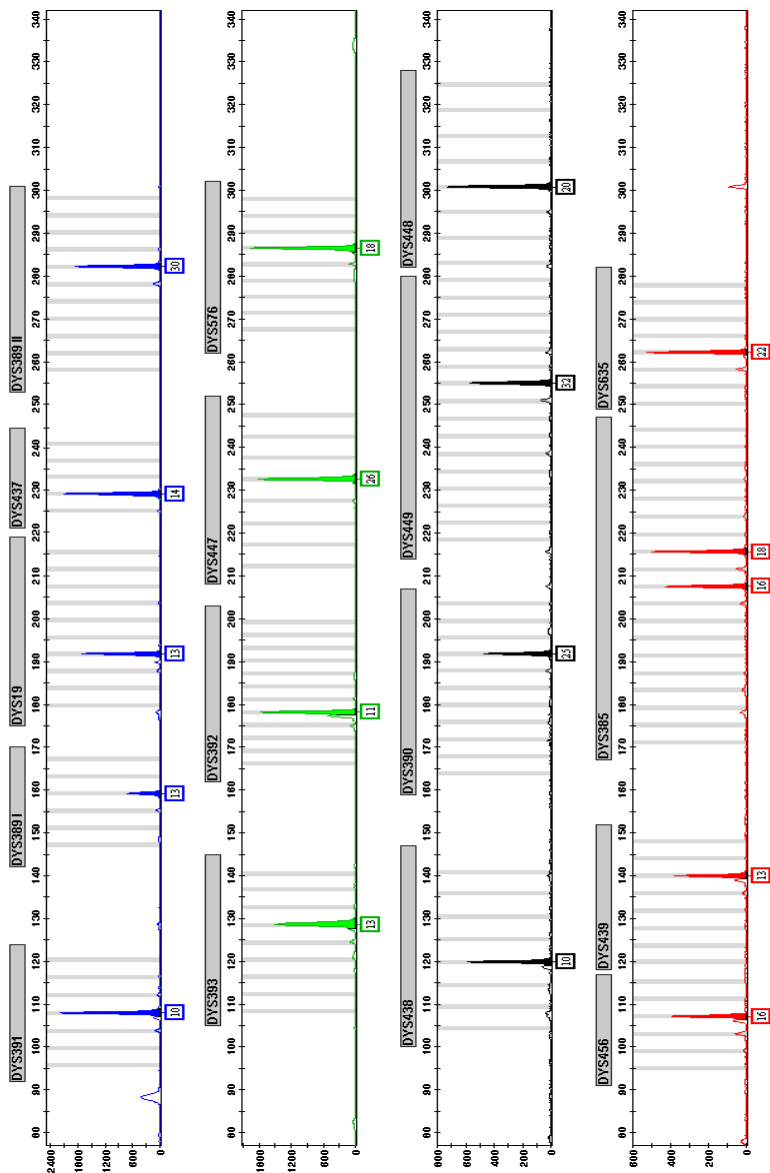


Рисунок 2 Контрольная ДНК МК1 CO<sub>r</sub>DIS Y . Использовано 250 пг контрольной ДНК.

## 6. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

**Производитель** ООО «ГОРДИЗ»

**Юридический и почтовый адрес:** 143026 г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул. Луговая д.4, стр.4

**Телефон/факс:** +7 (499) 670-40-41,

**Домашняя страница:** [www.gordiz.ru](http://www.gordiz.ru)

**e-mail:** [gordiz@gordiz.ru](mailto:gordiz@gordiz.ru)