

**Набор реагентов для мультиплексного анализа
19-ти STR-маркеров и локуса амелогенина человека**

Инструкция пользователя

Оглавление

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ	2
1.1 Описание продукта	2
1.2 Компоненты набора и состав	4
1.3 Условия хранения	4
1.4 Основные характеристики набора	5
1.6 Сопутствующие материалы	5
2. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ	6
2.1 Постановка реакции	6
2.2 Условия амплификации	6
3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130/3130XL	8
3.1 Создание матрикса / спектральная калибровка	8
3.2 Условия капиллярного электрофореза.	10
3.3 Создание Instrument Protocol	11
3.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	11
3.5 Запуск прибора	12
3.6 Оптимизация интенсивности сигналов	13
4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3500/3500XL	15
4.1 Создание матрикса / спектральная калибровка	15
5.2 Создание Instrument Protocol	17
5.3 Создание Assay	17
5.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	17
5.5 Запуск прибора	18
5.6 Оптимизация интенсивности сигналов	19
5. АНАЛИЗ ДАННЫХ	19

5.1	Стандарт длины S550	19
5.2	Диапазоны размеров аллелей STR маркеров	20
5.3	Амплификация контрольной ДНК	21
5.4	Аллельная лестница	22
6.	ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	23

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

1.1 Описание продукта

CO_rDIS «ЭКСПЕРТ» – набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦП-анализа 19-ти локусов, содержащих короткие tandemные повторы (STR-локусы) и локуса гена амелогенина в геномной ДНК человека. Из 19-ти анализируемых STR-локусов 13 составляют стандартную панель CODIS (системы комбинированного индекса ДНК: D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, и VWA), 5 локусов рекомендованы ENFSI (Европейской Сетью Институтов Криминалистики) для расширения европейских национальных баз данных (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 и D22S1045) и локус SE33 - наиболее полиморфный из известных STR-маркеров. Праймеры для ПЦП подобраны с учетом проведения амплификации всех 20-ти локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦП продуктов < 420 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Анализ результатов ПЦП 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 ПЦП.

Для получения полного STR-профиля образца достаточно 0,2 нанограмм недеградированной ДНК. Оптимальное количество – 0.5 нанограмм.

Общий объем реакции **25 мкл**. Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 10 мкл.

Набор CO_rDIS «ЭКСПЕРТ» может использоваться для создания национальных криминалистических баз данных в странах, использующих в качестве стандартной панели локусов маркеры CODIS (Combined DNA Index System), а так же Европейских баз данных на основе ESS (European standard set), включая страны, использующие SE33 как обязательный маркер. Благодаря максимальному дискриминирующему потенциалу среди доступных на данных

момент коммерческих наборов, CO_rDIS «ЭКСПЕРТ» прекрасно подходит для ДНК-идентификации личности, анализа родства (например, экспертизы спорного отцовства), а так же для анализа химеризма после пересадки костного мозга.

Набор валидирован для проведения ПРЦ 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_rDIS «ЭКСПЕРТ»

Маркер	Реф. номер GenBank®	Реф. аллель GenBank®	Хромосомная локализация	Структура единицы повтора реф. аллеля
D1S1656	NC_000001.9	17	1q42	[TAGA] ₁₆ [TGA][TAGA][TAGG] ₁ [TG] ₅
D2S441	AL079112	12	2p14	[TCTA] ₁₂
D3S1358	NT_005997	18	3p21.31	TCTA [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅
D5S818	AC008512	11	5q23.2	[AGAT] ₁₁
D7S820	AC004848	13	7q21.11	[GATA] ₁₃
D8S1179	AF216671	13	8q24.13	[TCTA] ₃
D10S1248	AL391869	13	10q26.3	[GGAA] ₁₃
D12S391	G08921	19.3	12p13.2	[AGAT] ₅ GAT[AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT
D13S317	AL353628	11	13q31.1	[TATC] ₁₁
D16S539	AC024591	11	16q24.1	[GATA] ₁₁
D18S51	AP001534	18	18q21.33	[AGAA] ₁₈
D21S11	AP000433	29	21q21.1	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA[TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] ₁₁
D22S1045	AL022314	17	22q12.3	[ATT] ₁₄ ACT [ATT] ₂
CSF1PO	X14720	12	5q33.1	[AGAT] ₁₂
FGA	M64982	21	4q31.3	[TTTC] ₃ TTTTCT[CTTT] ₁₃ CTCC[TTCC] ₂
SE33	V00481	26.2	6q14	[AAAG] ₈ AA [AAAG] ₁₇
TH01	D00269	9	11p15.5	[TCAT] ₉
TPOX	M68651	11	2p25.3	[AATG] ₁₁
VWA	M25858	18	12p13.31	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃
Амелогенин X M55418	X	X	Xp22.1-22.3	
Амелогенин Y M55419	Y	Y	Yp11.2	

Таблица 1 Сводная информация о STR-локусах набора CO_rDIS «ЭКСПЕРТ». Структура единицы повтора приводится в соответствии с рекомендациями Международного Общества Судебных Генетиков (International Society for Forensic Genetics - ISFG) [Bär et al, 1997]. Лocus амелогенина не является STR-маркером, однако продукты амплификации этого локуса для хромосом X и Y различаются по длине.

1.2 Компоненты набора и состав

1. Пробирка с реакционной смесью	2 пробирки (200 реакций)
2. Раствор активатора	1 пробирка (200 реакций)
3. Деионизованная вода	1 пробирка 1.7 мл
4. Контрольная ДНК МК01	1 пробирка (40 реакций)
5. Стандарт длины S550	2 пробирка (240 нанесений)
6. Аллельная лестница	1 пробирка (20 нанесений)

Реакционная смесь представляют собой раствор, содержащий компоненты полимеразной цепной реакции включая Taq-полимеразу, смесь дНТФ, реакционный буфер, праймерную смесь.

Раствор активатора используется для активации реакционной смеси. Содержит буферный раствор и ионы магния Mg²⁺ в качестве активатора полимеразной цепной реакции.

Деионизованная вода предназначена для доведения реакций до рабочего объема.

Контрольная ДНК МК01 представляет собой 20 нг высокомолекулярной геномной ДНК мужчины в концентрации 0.1 нг/мкл с известным генотипом по всем исследуемым локусам (Таб. 2, Рис. 2). Предназначена для контроля этапов амплификации, электрофореза и анализа данных.

Стандарт длины S550 представляет собой смесь флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК разной длины, меченых спектральным аналогом LIZ, детектируемым в канале *Orange*. Стандарт длины S550 содержит 26 фрагментов 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, 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.

Аллельная лестница представляет собой смесь из 243 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. Аллельный лэддер содержит ПЦР-продукты и при несоблюдении мер предосторожности может быть источником контаминации остальных реагентов.

1.3 Условия хранения

Компоненты набора необходимо хранить при температуре от -15°C до

-20°C. После начала использования допускается хранение при температуре от 2°C до 8°C в течение 3 месяцев. Рекомендуется избегать многократных циклов замораживания и размораживания компонентов набора.

1.4 Основные характеристики набора

Количество одновременно анализируемых маркеров – 20;

Список одновременно анализируемых локусов: D3S1358, TH01, D12S391, D1S1656, D10S1248, D22S1045, D2S441, D7S820, D13S317, FGA, TPOX, D18S51, D16S539, D8S1179, CSF1PO, D5S818, VWA, D21S11, SE33, Амелогенин;

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 5;

Оптимальное количество вносимой ДНК: 0,5 нг

Предел чувствительности: < 50 пг;

Дискриминирующий потенциал набора: менее 1 из 10²¹.

1.5 Гарантии качества

Качество каждого компонента набора проверено и контролируется в процессе производства. Каждый выпущенный лот реагентов регулярно проверяется на соответствие заявленным характеристикам в течение 18 месяцев. В случае возникновения вопросов относительно качества набора CO_rDIS «ЭКСПЕРТ», просим незамедлительно связаться с ООО «ГОРДИЗ».

1.6 Сопутствующие материалы

Необходимые материалы, не входящие в набор. Поставляются ООО «ГОРДИЗ» бесплатно:

Матриксный стандарт CS7 для ABI 3130/3130xl (ООО «ГОРДИЗ»).

Бины и панели для GeneMapper™, макрос для Genotyper™ (ООО «ГОРДИЗ»).

Материалы, поставляемые другими производителями

Реагент	Производитель	Каталожный номер
Буфер TAPS	ЗАО «СИНТОЛ»	ТАПС
Полимер ПДМА6	ЗАО «СИНТОЛ»	ПДМА-6
Hi-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. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

2.1 Постановка реакции

В каждую пробирку необходимо внести 10 мкл Реакционной смеси, 5 мкл Активатора. Затем внести до 10 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0,2 – 0,5 нг. Оптимальное количество вносимой ДНК – 0,5 нг. Вносимый объем ДНК зависит от ее концентрации. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет **10 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>
Реакционная смесь	10 мкл
Раствор Активатора 5X	5 мкл
Геномная ДНК (0,2 – 2 нг)	до 10 мкл
Деионизированная вода, до конечного объема	25 мкл

CoDIS «ЭКСПЕРТ» 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 деионизированной воде происходит постоянный гидролиз ДНК. Для длительного хранения рекомендуется разведение ДНК в буферах (pH > 7), содержащих небольшое количество ЭДТА (например, TE с 0,1 mM 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** (5 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (деионизированная вода вместо ДНК).

2.2 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 59°C до 72°C. В связи с высокой сложностью амплификации с участием более 20 пар праймеров **данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции.**

Параметры ПЦР:

94°C 3 мин

98°C 30 сек

59°C 120 сек 4 цикла

72°C* 90 сек

94°C 30 сек

59°C 120 сек 6 циклов

72°C* 90 сек

90°C 30 сек

59°C 120 сек 18 циклов

72°C* 75 сек

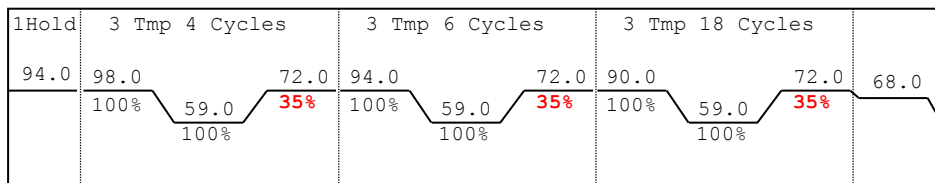
68°C 10 мин

15°C ∞

* Рекомендуемая скорость нагрева с 59°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 амплификаторе GeneAmp 9700 не предусмотрена возможность точного программирования скорости изменения температуры, но реализовано ограничение скорости 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 препаратами ДНК (< 0,1 нг ДНК) можно повысить чувствительность реакции добавив 2-4 дополнительных цикла ПЦР. Не рекомендуется превышать 34 цикла амплификации. 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.

3. 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_rDIS «ЭКСПЕРТ» необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “**any5dyes**” с использованием матрикс-стандарта CS5.

3.1 Создание матрикса / спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации CO_rDIS «ЭКСПЕРТ» на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным матрикс-стандартом CS5 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру: CS5). Матрикс-стандарт содержит смесь 5-ти фрагментов разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями. Эти красители использованы в наборе для мечения ПЦР-продуктов и размерного стандарта S550.

Для приготовления рабочего раствора матрикс-стандарта CS5 добавить 50 мкл деионизованной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS5 (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 °C – 8 °C до 2 недель. Для более длительного хранения раствор следует заморозить. Следует избегать повторного размораживания.

При проведении спектральной калибровки **настоятельно рекомендуется** использовать только чистые септы для емкостей, содержащих буферный раствор и воду. Использование при проведении спектральной калибровки ранее использованных септ, может приводить к попаданию в область анализа ранее исследованных меченных ПЦР продуктов, и препятствовать успешному анализу матричного стандарта.

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

Ni-Di™ формамид	40 мкл
Раствор CS5	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-DiTM формамид	160 мкл
Раствор CS5	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_CS5
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_CS5
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-Well

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

Ввести в позиции A01:

Sample Name	например, CS5
Priority	например, 100
Instrument Protocol	Spectral36_POP4_ CS5 (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 **OK** 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_any5_CS5**). 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 CS5 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, **CS5_[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.

3.2 Условия капиллярного электрофореза.

Перед проведением первого анализа продуктов амплификации CoRDIS «ЭКСПЕРТ» 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	5
Voltage Number of Steps	40
Voltage Step Interval	15
Data Delay Time	1
Run Voltage	15.0
Run Time	1700

Нажать **Save As** и ввести удобное название для созданного модуля (например, CO_rDIS). Нажать **OK** и покинуть редактор модуля нажав **Close**.

3.3 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 _r DIS
Type	REGULAR
Run Module*	CO _r DIS
Dye Set	Any5Dye

*значение параметра см. в п. 3.2

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

3.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

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

<u>Компонент</u>	<u>Объем на один образец</u>
------------------	------------------------------

Ni-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 ПЦП-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_rDIS «ЭКСПЕРТ» не требует температурной денатурации образцов!

3.5 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:

Параметр	Значение
Name	Например CO _r DIS_[<i>data</i>]
Application	выбрать GeneMapper
Plate Type	96-Well

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

Шаг В Заполнение таблицы

Параметр	Значение
----------	----------

Sample Name	Название образца
Priority	обычно 100 (очередность анализа по возрастанию)
Sample Type	Sample / Allelic Ladder / Positive Control / Neg. Control
Size Standard	S550
Panel	CO _r DIS
Analysis Method	Например, GORDIZ
User-defined 1-3	
SNP Set	
Results Group	Выбрать соответствующий Results Group
Instrument Protocol	Run36_POP4_CS5

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)**.

3.6 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.

При работе с некоторыми модификациями генетических анализаторов ABI3130, оснащенных высокочувствительными флуоресцентными датчиками могут наблюдаться нежелательные эффекты, связанные с избыточным уровнем сигнала флуоресценции амплифицированных продуктов на этапе анализа результатов электрофореза. В этом случае рекомендуется снизить количество вносимого в реакцию генетического материала геномной ДНК. Дополнительно, снижение избыточного уровня сигнала флуоресценции амплифицированных

продуктов может быть достигнуто снижением времени инъекции образцов до 3 сек и/или снижением вольтажа до 1.5 kV.

4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3500/3500XL

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 CO₂DIS «ЭКСПЕРТ» необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “any5dyes” с использованием матрикс-стандарта CS5.

4.1 Создание матрикса / спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации CO₂DIS «ЭКСПЕРТ» на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным матрикс-стандартом CS5 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру: CS5). Матрикс-стандарт содержит смесь 5-ти фрагментов разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями. Эти красители использованы в наборе для мечения ПЦР-продуктов и размерного стандарта S550.

Для приготовления рабочего раствора матрикс-стандарта CS5 добавить 50 мкл деионизованной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS5 (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 °C – 8 °C до 2 недель. Для более длительного хранения раствор следует заморозить. Следует избегать повторного размораживания.

При проведении спектральной калибровки **настоятельно рекомендуется** использовать только чистые септы для емкостей, содержащих буферный раствор и воду. Использование при проведении спектральной калибровки ранее использованных септ, может приводить к попаданию в область анализа ранее исследованных меченных ПЦР продуктов, и препятствовать успешному анализу матричного стандарта.

Подготовка матрикс-стандарта для калибровки (ABI 3500 /8 капилляров)

Ni-Di™ формамид	80 мкл
Раствор CS5	8 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01-H01 96-луночного планшета. При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

Подготовка матрикс-стандарта для калибровки (ABI 3500XL/ 24 капилляра)

Hi-DiTM формамид	240 мкл
Раствор CS5	24 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01- H03 96-луночного планшета.
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

Спектральная калибровка

Шаг А – Создание Dye Set для спектральной калибровки

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software**.
В разделе **Analyze**, выбрать вкладку **Dye Sets**. В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового Dye Set). В появившемся окне указать параметры нового Dye Set:

Dye Set Name	CS5
Chemistry	Matrix standard
Dye Set Template	G5 Template
Arrange Dyes	оставить без изменений
Parameters:	
Matrix Condition Number	20.0
Minimal Quality Score	0.8

Нажать кнопку **Save**. Новый Dye Set (CS5) появится в списке.

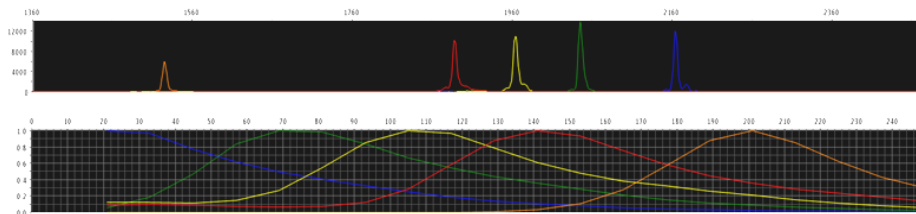
Шаг В – Проведение спектральной калибровки

Перейти в раздел **Maintenance** в программе **Data Collection Software**. В разделе **Calibrate**, выбрать вкладку **Spectral Calibration**. В открывшемся окне выбрать количество лунок в используемом планшете (**Number of Wells**) и позицию планшета в приборе (**Plate Position**). В пункте **Chemistry Standard** выбрать **Matrix standard**. В пункте **Dye Set** выбрать **CS5**. Запустить процесс калибровки нажав кнопку **Start Run**.

Шаг С – Оценка результатов спектральной калибровки

После завершения работы прибора проверить статус каждого капилляра (pass или fail). Высота пиков должна быть не менее 2.000 rfu, но ниже 15.000 rfu (оптимальный диапазон между 5000 и 10000 rfu).

Калибровка должна быть успешной минимум для 6 из 8 капилляров (или для 18 из 24 капилляров, соответственно). При использовании CS5 в качестве матричного стандарта, в окне профиля калибровки (Intensity vs Pixel Number) должна отражаться следующая последовательность пиков (слева на право) **синий-зеленый-желтый-красный-оранжевый**.



В случае успешной калибровки сохранить полученные результаты, нажав кнопку **Accept**.

5.2 Создание Instrument Protocol

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software**.
В разделе **Analyze**, выбрать вкладку **Instrument Protocols**. В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового Instrument Protocol). В появившемся окне указать параметры нового Instrument Protocol:

Application Type	HID
Dye Set	CS5
Run Module	например "HID36_POP4" (выбрать протокол соответствующий параметрам системы)
Protocol Name	COrDIS EXPERT

Нажать кнопку **Save**.

5.3 Создание Assay

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software**.
В разделе **Manage**, выбрать вкладку **Assays**. В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового Assay). В появившемся окне указать параметры нового Assay:

Assay Name	COrDIS EXPERT
Application Type	HID
Instrument Protocol	COrDIS EXPERT

Нажать кнопку **Save**.

5.4 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 ПЦП-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_rDIS «ЭКСПЕРТ» не требует температурной денатурации образцов!

5.5 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 5.1), **Instrument Protocol** (см. раздел 5.2), и **Assay** (см. раздел 5.3).

Шаг А Создание планшета

Перед началом анализа необходимо создать **Plate** (планшет), описывающий расположение образцов на планшете и содержащий инструкции для прибора. Для этого необходимо перейти в меню **Create New Plate** программы **Data Collection Software**. Появится диалоговое окно, в котором необходимо указать параметры нового планшета:

Name	Например CO _r DIS_[<i>dama</i>]
Plate Type	Fragment

Нажать кнопку **ОК**. Появится новая таблица со схемой исследуемого планшета.

Шаг В Заполнение таблицы

Для всех анализируемых лунок планшета необходимо указать

Sample name	имя объекта
Sample type	тип образца
Assay	CO _r DIS
Filename convention	структура имени файла
Results group	параметры сохранения файлов

Шаг С Запуск прибора и информация о статусе прибора

После создания схемы расположения образцов на планшете, нажмите на кнопку **Link Plate for Run**. В открывшемся окне указать положение планшета в приборе и запустить электрофорез нажатием кнопки **Start Run**.

5.6 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.

При работе с высокочувствительными генетическими анализаторами ABI3500 могут наблюдаться нежелательные эффекты, связанные с избыточным уровнем сигнала флуоресценции амплифицированных продуктов на этапе анализа результатов электрофореза. В этом случае рекомендуется снизить количество вносимого в реакцию генетического материала до 0,5 нг геномной ДНК. Дополнительно, снижение избыточного уровня сигнала флуоресценции амплифицированных продуктов может быть достигнуто снижением времени инъекции образцов до 5-7 сек.

5. АНАЛИЗ ДАННЫХ

5.1 Стандарт длины S550

Ниже приводится пример электрофореграммы с сигналами фрагментов стандарта 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, 400, 420, 440, 450, 500, 550.

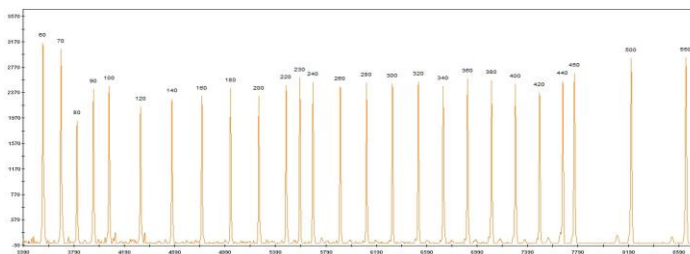


Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550. Размеры фрагментов.

5.2 Диапазоны размеров аллелей STR маркеров

Локус	Диапазон аллелей	Диапазон длин фрагментов	Аллели МК-1	Цвет метки
Amelogenin X	X	81	X	синий
Amelogenin Y	Y	84	Y	синий
D3S1358	8 – 21	93 - 147	15/17	синий
TH01	3 - 14	152 - 196	6/9.3	синий
D12S391	13 - 28	204 - 264	21/23	синий
D1S1656	9 - 21	275 - 324	14/17.3	синий
D10S1248	8 - 21	338 - 390	15/15	синий
D22S1045	8 - 19	400 - 450	15/15	синий
D2S441	8 - 19	84 - 134	14/14	зеленый
D7S820	5 - 16	137 - 181	10/12	зеленый
D13S317	5 - 17	188 - 236	11/11	зеленый
FGA	12.2 – 51.2	238 - 391	20/22.2	зеленый
TPOX	4 - 16	66 - 113	8/9	желтый
D18S51	7 - 27	124 - 200	14/16	желтый
D16S539	4 - 16	208 - 356	12/13	желтый
D8S1179	7 - 20	262 - 214	10/10	желтый
CSF1PO	5 - 16	317 - 361	9/11	желтый
D5S818	6 - 18	369 - 413	9/12	желтый
VWA	10 - 25	94 - 155	16/18	красный
D21S11	24 – 41.2	158 - 228	30.2/30.2	красный
SE33	4.2 – 50.2	233 - 403	24.2/29.2	красный

Таблица 2 Диапазон длин аллелей.

5.3 Амплификация контрольной ДНК

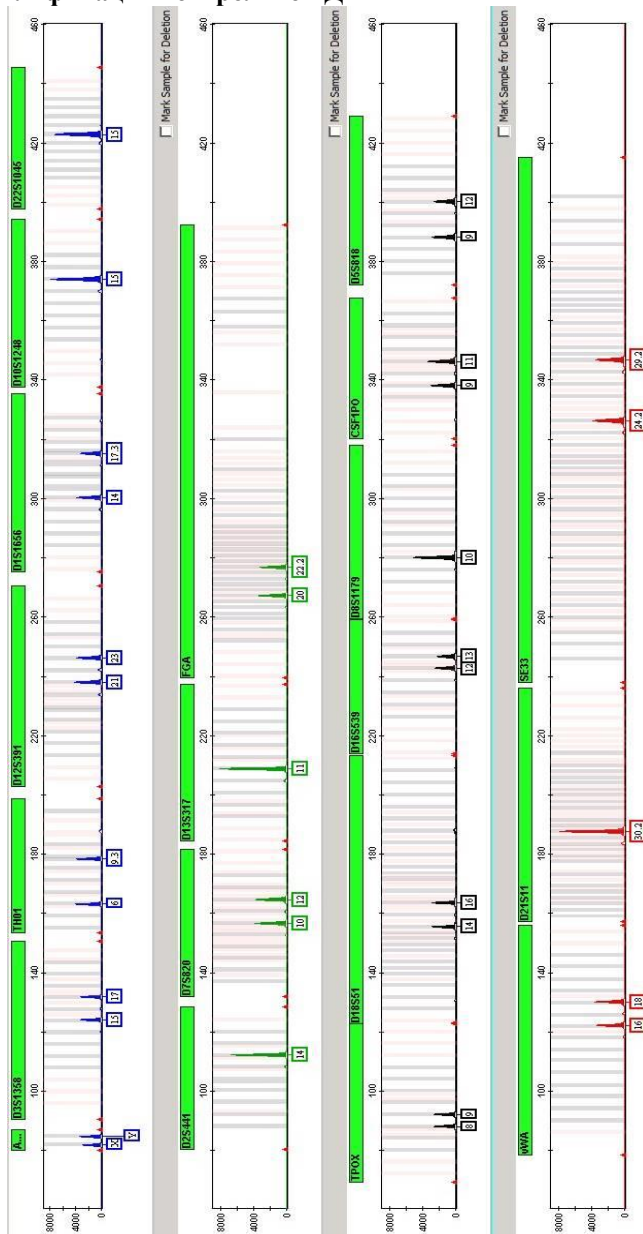


Рисунок 2 Контрольная ДНК МК01 CoDIS.

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

e-mail: gordiz@gordiz.ru