

COrDIS Horse

Набор реагентов для мультиплексного анализа 17-ти микросателлитных маркеров лошадей

Инструкция пользователя

Оглавление

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ	2
1.1 Описание продукта	2
1.2 Информация для заказа набора COrDIS Horse и COrDIS Horse Direct	4
1.3 Компоненты набора и состав (на примере кат. ном. HRS)	4
1.4 Условия хранения	5
1.5 Основные характеристики набора	5
1.6 Сопутствующие материалы	5
2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ	6
2.1 Контрольная ДНК	6
2.2 Размерный стандарт S550	6
3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ	7
3.1 Стандартный протокол амплификации	7
3.2 Протокол амплификации с использованием материала на бумажных носителях	7
3.3 Условия амплификации	8
4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130/3130XL	10
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
5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3500/3500XL	15
5.1 Создание матрикса / спектральная калибровка	16
5.2 Создание Instrument Protocol	18
5.3 Создание Assay	18
5.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	19
5.5 Запуск прибора	19
5.6 Оптимизация интенсивности сигналов	20

6.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	21
6.1	Импорт файлов для анализа в программе GeneMapper	21
6.2	Стандарт длины S550	23
6.3	Диапазоны размеров микросателлитных маркеров	24
6.4	Аmplификация контрольной ДНК	25
7	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	25
8	ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	26

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

1.1 Описание продукта

COrDIS Horse – набор реагентов для молекулярно-генетической характеристики лошадей с целью анализа родства и ДНК-индивидуализации животных на основе мультиплексного ПЦР-анализа 17-ти локусов, содержащих короткие tandemные повторы (STR), известные также как микросателлитные локусы.

Анализируемые STR-локусы составляют стандартную панель маркеров, рекомендованную Международным Обществом Генетики Животных (International Society of Animal Genetics - ISAG): AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, HTG6, HTG7, LEX3, VHL20. Все эти маркеры представляют собой tandemные динуклеотидные повторы.

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 17-ти локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов < 320 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 COrDIS Horse 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.

Реакционная смесь в наборе алиquotирована в реакционных стрипованных пробирках 0,2 мл и поставляется в лиофилизированном виде. 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.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах:

GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, ProFlex PCR System, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, SimpliAmp™ Thermal Cycler

Анализ ПЦР-продуктов может проводиться с использованием генетических анализаторов ABI PRISM® 310/3100/3100-Avant/3130/3130XL/3500/3500XL (Applied Biosystems) и Нанофор 05 (Синтол).

Таблица 1. Описание микросателлитных маркеров COrDIS Horse

Локус	Хромосомная локализация	Тип повтора	Структура единицы повтора
АНТ4	24q14	сложный	(AC) _n AT(AC) _n
АНТ5	8	простой	(GT) _n
ASB2	15q21.3-q23	простой	(GT) _n
ASB17	2p14-p15	простой	(AC) _n
ASB23	3q22.1-q22.3	простой и сложный	(TG) _n и (TG) _n TT(TG) ₄
CA425	28q18	простой	(GT) _n
HMS1	15	простой	(TG) _n
HMS2	10	сложный	(CA) _n (TC) ₂
HMS3	9	сложный	(TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n и (TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n GA(CA) ₅
HMS6	4	простой	(GT) _n
HMS7	1q25	сложный	(AC) ₂ (CA) _n
HTG4	9	сложной	(TG) _n AT(AG) ₅ AAG(GA) ₅ ACAG(AGGG) ₃
HTG6	15q26-q27	простой	(TG) _n
HTG7	4	простой	(GT) _n
HTG10	21	простой и сложный	(TG) _n и TATC(TG) _n
LEX3	Xq	простой	(TG) _n
VHL20	30	простой	(TG) _n

1.2 Информация для заказа набора COrDIS Horse и COrDIS Horse Direct

- Стрипы 8 x 0.2 мкл, пробирки с отдельно прикрепленными крышками

Название	Реакций в наборе	Каталожный номер
COrDIS Horse	12 x 8 пробирок (96 реакций)	HRS
COrDIS Horse Direct	12 x 8 пробирок (96 реакций)	HRSD

1.3 Компоненты набора и состав (на примере кат. ном. HRS)

1. Стрипы с реакционными смесями 8 x 0.2 мл	12 стрипов
2. Раствор активатора	500 мкл
3. Деионизированная вода	2 пробирки , 1.7 мл
4. Контрольная ДНК HRS12, (лиоф.)	1 пробирка (20 реакций)
5. Стандарт длины S550, (лиоф.)	1 пробирка (120 нанесений)

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.

Раствор активатора используется для разведения лиофилизированной реакционной смеси. Содержит буферный раствор и ионы магния Mg^{2+} в качестве активатора полимеразной цепной реакции.

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

Контрольная ДНК HRS12 представляет собой лиофилизированную геномную ДНК лошади с известным генотипом по всем исследуемым локусам (Рис. 2). Предназначена для контроля этапов амплификации, электрофореза и анализа данных. Поставляется в сухом 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 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 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).

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. После получения наборы должны храниться при температуре 2 - 8°C. Флуоресцентно меченные праймеры и размерный стандарт S550 чувствительны к воздействию света и должны храниться в темном месте.

Контрольная ДНК 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.

1.5 Основные характеристики набора

Количество одновременно анализируемых маркеров – 17;

Список одновременно анализируемых локусов: АНТ4, АНТ5, ASB17, ASB2, ASB23, СА425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, НТG10, НТG4, НТG6, НТG7, LEX3 и VHL20;

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 5;

Оптимальное количество вносимой ДНК: 5 нг

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.

1.6 Сопутствующие материалы

Необходимые материалы, не входящие в набор:

Матриксный стандарт CS5 для ABI 3130, ABI 3130xl, ABI3500, Нанофор 05 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру CS5).

Бины и панели для GeneMapper™ – предоставляется по запросу.

Материалы, поставляемые другими фирмами

Реагент	Производитель	Каталожный номер
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. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ

2.1 Контрольная ДНК

Добавить 20 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором в пробирку с сухой контрольной ДНК. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Для проведения ПЦР необходимо добавить 1 мкл контрольной ДНК в реакционную пробирку. 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. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. После разведения 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.

3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

3.1 Стандартный протокол амплификации

В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Активатора. Оптимальное количество вносимой ДНК 1–5 нг. Вносимый объем ДНК зависит от ее концентрации. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет **20 мкл**. При необходимости довести общий объем реакции до 20 мкл деионизированной водой, поставляемой в составе набора.

<u>Компоненты набора</u>	<u>Объем на 1 реакцию</u>
Раствор активатора	5 мкл
Геномная ДНК (1–5 нг)	до 20 мкл
Деионизированная 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. При разведении геномной ДНК водой важно помнить, что в деионизированной воде происходит постоянный гидролиз ДНК. Для длительного хранения рекомендуется разведение ДНК в буферах ($\text{pH} > 7$), содержащих небольшое количество ЭДТА (например, TE с $\leq 0,1 \text{ mM}$ 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** (1 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (деионизированная вода вместо ДНК).

3.2 Протокол амплификации с использованием материала на бумажных носителях

Набор реагентов COrDIS Horse Direct позволяет проводить амплификацию материала с бумажных носителей. При исследовании биоматериала на бумажных носителях в каждую пробирку необходимо внести 25 мкл реагента COrDIS Direct, затем внести исследуемый образец. Оптимальный диаметр вносимого предмета-носителя (панч карты) составляет 1.2 мм. Оптимальное количество вносимого материала зависит от структуры материала носителя и особенностей, собираемых на носитель образцов.

Компоненты набора	Объем на 1 реакцию
Реагент COrDIS Direct	25 мкл
Геномная ДНК	1 панч

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.

3.3 Условия амплификации

Приведённые 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 17 пар праймеров **данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции.**

Параметры ПЦР:

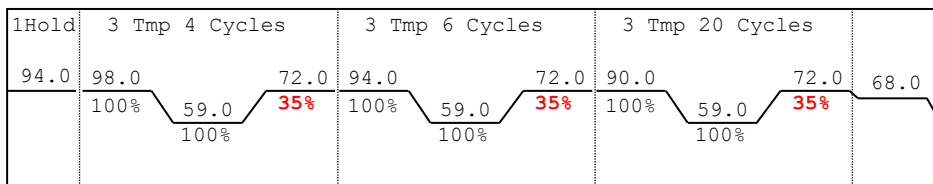
94°C	3 мин	
98°C	30 сек	
59°C	120 сек	4 цикла
72°C*	90 сек	
94°C	30 сек	
59°C	120 сек	6 циклов
72°C*	90 сек	
90°C	30 сек	
59°C	120 сек	18 циклов
72°C*	75 сек	
68°C	10 мин	
15°C	∞	

* 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 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.



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 COrDIS Horse необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “any5dyes” с использованием матрикс-стандарта CS5.

4.1 Создание матрикса / спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Horse 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 деионизированной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS5 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 -20°C в течение 3 месяцев. 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-Di™ 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 во 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 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 **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 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 **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.

4.2 Условия капиллярного электрофореза

Перед проведением первого анализа продуктов амплификации COrDIS Horse 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	13.0
Run Time	1700

Нажать **Save As** и ввести удобное название для созданного модуля (например, COrDIS Horse). 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_ Horse
Type	REGULAR
Run Module*	COrDIS Horse
Dye Set	Any5Dye

*значение параметра см. в п. 4.2

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.

После перемешивания добавить по 10 мкл смеси в каждую лунку планшета. Затем внести в лунки по 1 мкл ПЦР-продукта. При необходимости удалить пузыри со дна лунок планшета коротким центрифугированием.

Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:

95°C 2 мин

4°C 1 мин

Загрузить планшет с денатурированными образцами в прибор в соответствии с инструкцией пользователя от производителя оборудования.

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 COrDIS_Horse <i>_[data]</i>
Application	выбрать GeneMapper
Plate Type	96-Well

Нажать кнопку **ОК**. 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 / Positive Control / Neg. Control
Size Standard	S550
Panel	COrDIS_Horse
Analysis Method	Например, COrDIS_Horse
User-defined 1-3	
SNP Set	
Results Group	Выбрать соответствующий Results Group

Instrument Protocol

Run36_ Horse

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 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

В зависимости от состояния используемого прибора, параметр Injection Time может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала. Параметр Run Time также может быть скорректирован пользователем в случае, если рекомендуемое время фореа является избыточным (все фрагменты размерного стандарта детектируются существенно раньше отведенного времени) или недостаточным (не все фрагменты размерного стандарта детектируются за отведенное время). Оптимальное время фореа в наибольшей степени зависит от текущего состояния капилляров и полимера в генетическом анализаторе и может меняться со временем.

5. 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 COrDIS Horse необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “any5dyes” с использованием матрикс-стандарта CS5.

5.1 Создание матрикса / спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Horse 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 деионизированной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS5 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 -20°C в течение 3 месяцев. 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)

Ni-Di™ 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.

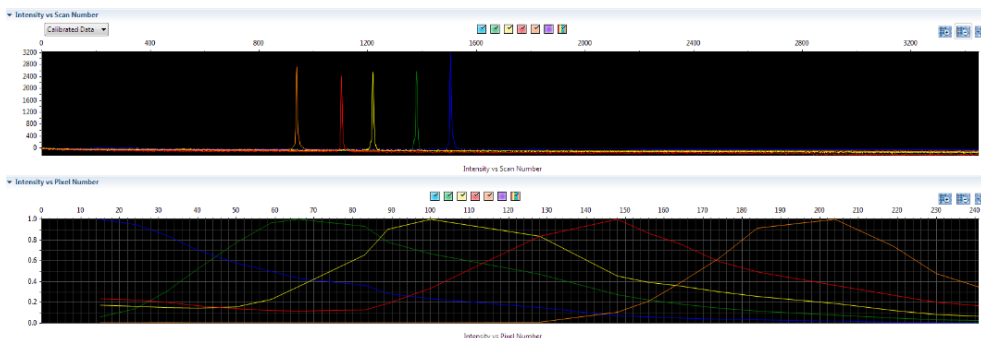
Шаг В – Проведение спектральной калибровки

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 500 rfu, но ниже 10.000 rfu (оптимальный диапазон между 1000 и 5000 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 **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_Horse

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_Horse

Application Type HID

Instrument Protocol COrDIS_Horse

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.

После перемешивания добавить по 10 мкл смеси в каждую лунку планшета. Затем внести в лунки по 1 мкл ПЦР-продукта. При необходимости удалить пузыри со дна лунок планшета коротким центрифугированием.

Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:

95°C 2 мин
4°C 1 мин

Загрузить планшет с денатурированными образцами в прибор в соответствии с инструкцией пользователя от производителя оборудования.

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 COrDIS_[<i>dama</i>]
Plate Type	HID

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 (sample)
Assay	COrDIS (add from library – выбрать COrDIS)
Filename convention My_FNC)	структура имени файла (add from library – выберите)
Results group	параметры сохранения файлов (папка, в которую будут сохранены результаты. add from library – выберите My_Fragment_Analysis_Result_Group или Gordiz)

Левой кнопкой мышки выделите все заполненные образцы, затем проставьте галочки в выбранных ранее параметрах Assay, Filename convention и Results group.

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

В зависимости от состояния используемого прибора, параметр Injection Time может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала. Параметр Run Time также может быть скорректирован пользователем в случае, если рекомендуемое время фореза является избыточным (все фрагменты размерного стандарта детектируются существенно раньше отведенного времени) или недостаточным (не все фрагменты размерного стандарта детектируются за отведенное время). Оптимальное время

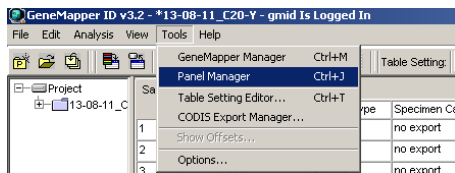
фореза в наибольшей степени зависит от текущего состояния капилляров и полимера в генетическом анализаторе и может меняться со временем.

6. АНАЛИЗ ДАННЫХ

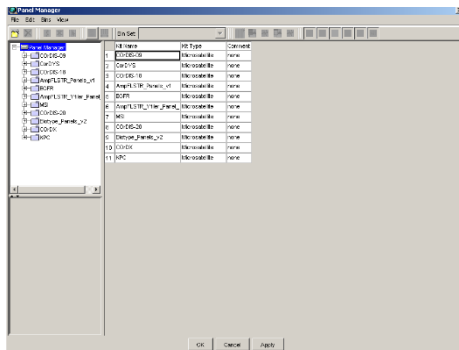
6.1 Импорт файлов для анализа в программе GeneMapper ID 3.2

Для анализа данных в программе GeneMapper ID необходимо импортировать в нее необходимые файлы с бинами, панелями, размерным стандартом и методом анализа по следующей инструкции:

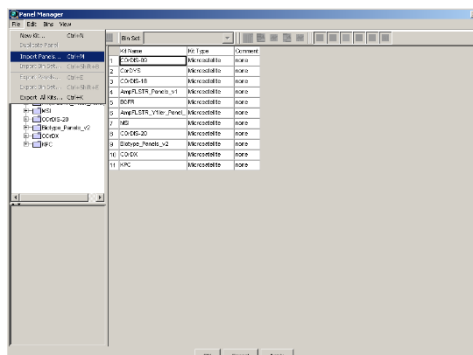
Выбрать пункт меню **Tools->Panel Manager**.



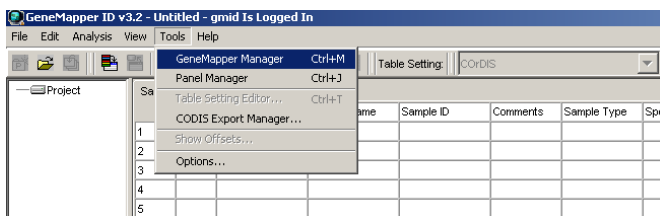
В левом верхнем сегменте открывшегося окна установить курсор на позицию **Panel Manager**



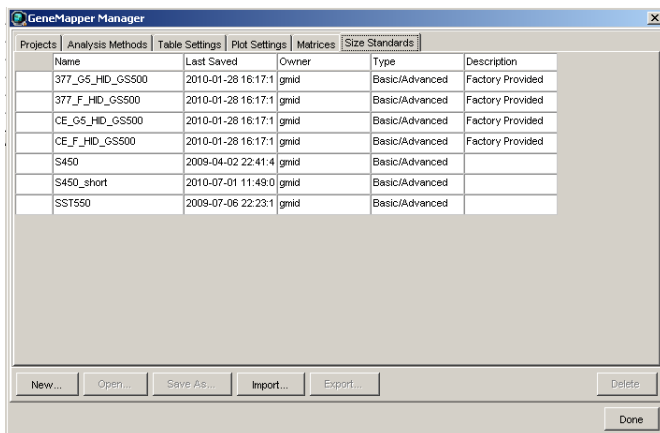
В меню выбрать **File->Import panels....**



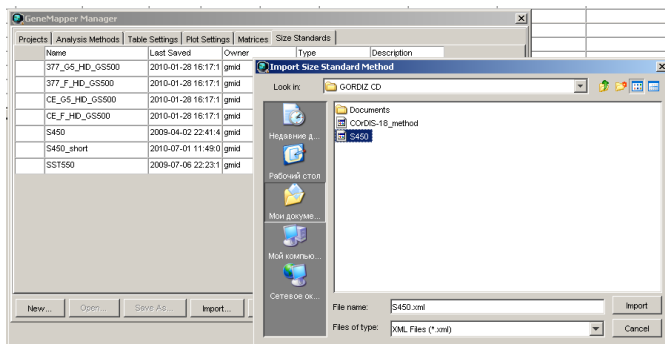
В открывшемся окне найти и выбрать файл с панелями (например файл CoDIS Horse). Загрузить нажатием кнопки **Import**.
Выбрать пункт меню **Tools->GeneMapper Manager**.



В открывшемся окне выбрать вкладку **Size Standards**.



Нажать кнопку **Import** и выбрать файл размерного стандарта **S550**. Загрузить файл нажатием кнопки **Import**.



Перейти во вкладку **Analysis Method**, нажать кнопку **Import**, выбрать файл COrDIS_Horse_method, загрузить файл нажатием кнопки **Import**.

При анализе данных в GeneMapper использовать следующие параметры:

Параметр	Значение
Analysis Method	COrDIS_Horse
Panel	COrDIS_Horse
Size Standard	S550

6.2 Стандарт длины S550

Ниже приводится пример электрофореграммы с сигналами фрагментов стандарта длины S550 в канале детекции *Orange*. Обозначения 26 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 и 550.

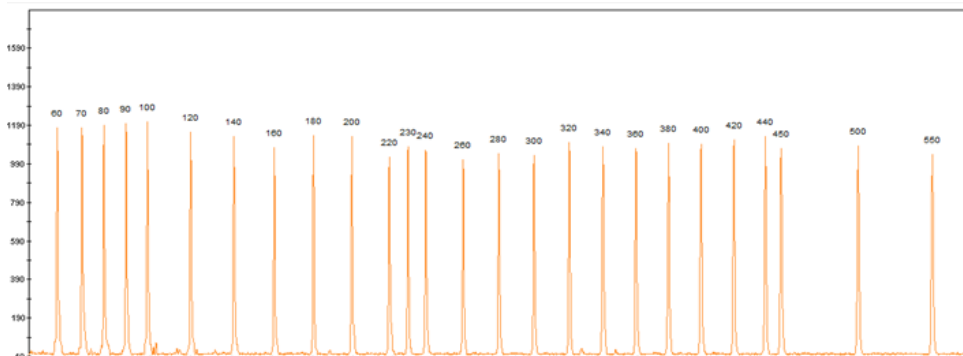


Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550. Размеры фрагментов.

6.3 Диапазоны размеров микросателлитных маркеров

Локус	Диапазон длин аллелей	Аллели HRS-12	Цвет метки
VHL20	91-111	L/N	синий
HTG4	131-142	K/M	синий
АНТ4	142-161	J/K	синий
HMS7	174-191	J/K	синий
HTG6	86-105	G/J	зеленый
АНТ5	130-146	N/N	зеленый
HMS6	158-172	O/P	зеленый
ASB23	242-272	K/L	зеленый
ASB2	281-309	B/O	зеленый
HTG10	100-123	L/S	желтый
HTG7	131-141	O/O	желтый
HMS3	155-175	M/P	желтый
HMS2	223-247	H/L	желтый
ASB17	99-131	G/R	красный
LEX3	150-175	M/P	красный
HMS1	181-202	I/J	красный
CA425	220/242	N/N	красный

Таблица 2 Диапазон длин аллелей.

6.4 Амплификация контрольной ДНК

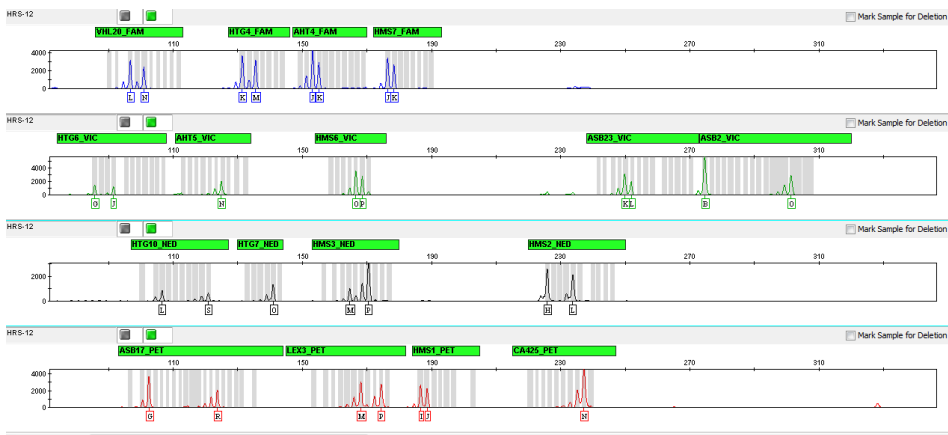
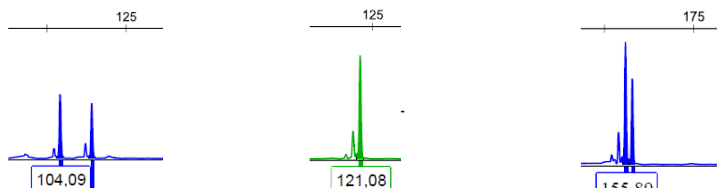


Рисунок 2 Контрольная ДНК HRS12. В реакцию внесен 1 мкл контрольной ДНК.

7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе программное обеспечение генерирует флуоресцентный профиль, отражающий электрофоретическую подвижность ПЦР-продуктов. Благодаря стандарту длины S550 размеры продуктов амплификации определяются с точностью < 1 п.н. Программа GeneMapper позволяет определить аллельные варианты для каждого маркера. Полученные генотипы разных животных можно параллельно сравнивать для подтверждения или исключения родственных отношений.

Каждому маркеру на электрофореграмме может соответствовать один или два ПЦР-продукта, что соответствует гомо- и гетерозиготному состоянию локуса. Разница в длине аллелей обычно кратна 2, что отражает различия в количестве динуклеотидных повторов. Для корректного определения генотипа необходимо учитывать природу статтеров. Статтеры – побочные продукты амплификации микросателлитных маркеров. Для динуклеотидных маркеров, к которым относятся все локусы набора COrDIS Horse, типичны статтеры размером -2 п.н. по отношению к основному продукту. Интенсивность сигнала статтера может достигать 50% от интенсивности продукта аллеля. При разнице в длине аллелей в 2 п.н. статтер более длинного аллеля накладывается на короткий аллель существенно увеличивая уровень его сигнала (Рисунок 3 В)



А**Б****В**

Рисунок 3 А – Пример гетерозиготного генотипа 104/114,
 Б – Пример гомозиготы 121,
 В – Пример гетерозиготы 155/157 с наложением статтера на
 аллель 155.

8. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель: ООО «ГОРДИЗ»

Юридический и почтовый адрес: 143026 г. г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул. Большой Бульвар, д.42, стр. 1, пом.337

Телефон/факс: +7 (499) 670-40-41,

Домашняя страница: www.gordiz.ru

e-mail: gordiz@gordiz.ru