

## 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	Компоненты набора и состав	4
1.3	Условия хранения	5
1.4	Основные характеристики набора	5
1.5	Гарантии качества	5
1.6	Сопутствующие материалы	5
<b>2.</b>	<b>РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ</b>	<b>6</b>
2.1	Размерный стандарт S550	6
2.2	Аллельный лэддер	6
<b>3.</b>	<b>ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ</b>	<b>7</b>
3.1	Постановка реакции	7
3.2	Условия амплификации	7
<b>4.</b>	<b>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130/3130XL</b>	<b>9</b>
4.1	Создание матрикса / спектральная калибровка	9
4.2	Условия капиллярного электрофореза.	11
4.3	Создание Instrument Protocol	12
4.4	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	12
4.5	Запуск прибора	13
4.6	Оптимизация интенсивности сигналов	14
<b>5.</b>	<b>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3500/3500XL</b>	<b>15</b>

5.1	Создание матрикса / спектральная калибровка	15
5.2	Создание Instrument Protocol	18
5.3	Создание Size Standard	19
5.4	Создание QC Protocol	19
5.5	Создание Assay	21
5.6	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	21
5.7	Запуск прибора	22
5.8	Оптимизация интенсивности сигналов	23
<b>6.</b>	<b>АНАЛИЗ ДАННЫХ</b>	<b>23</b>
6.1	Стандарт длины S550	23
6.2	Амплификация контрольной ДНК	24
6.3	Аллельная лестница CO <sub>r</sub> DIS Ystr	25
<b>7.</b>	<b>ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ</b>	<b>25</b>

## 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

### 1.1 Описание продукта

CO<sub>r</sub>DIS Ystr – 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 18-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. Общий объем реакции **25 мкл**.

Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 10 мкл. Набор CO<sub>r</sub>DIS Ystr может использоваться для идентификации личности в смешанных объектах, даже в тех случаях, когда преобладающим компонентом смеси является женская ДНК, а также для анализа родства по мужской линии.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах: GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, ProFlex PCR System, SimpliAmp™ Thermal Cycler, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler. Анализ ПЦР-продуктов может проводиться с использованием генетических анализаторов ABI PRISM® 310/3130/3130XL/3500/3500XL (Applied Biosystems), Нанофор 05 (СИНТОЛ).

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

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 Ystr. Структура единицы повтора приводится в соответствии с рекомендациями Международного Общества Судебных Генетиков (International Society for Forensic Genetics - ISFG) [Bär et al, 1997].

## 1.2 Компоненты набора и состав

1. Пробирка с реакционной смесью	2 пробирки (1 мл)
2. Раствор активатора	1 пробирка (1 мл)
3. Деионизованная вода	1 пробирка 1.7 мл
4. Контрольная ДНК МК01	1 пробирка (0.1 нг/мкл)
5. Стандарт длины S550	2 пробирки (120 мкл)
6. Аллельная лестница	1 пробирка (20 мкл)

**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  $Mg^{2+}$  в качестве активатора полимеразной цепной реакции.

**Деионизованная вода** предназначена для доведения реакций до рабочего объема.

**Контрольная ДНК МК01** представляет собой высокомолекулярной геномной ДНК мужчины в концентрации 0.1 нг/мкл с известным генотипом по всем исследуемым локусам (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 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. Аллельная лестница 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 2 месяцев. Рекомендуется избегать многократных циклов замораживания и размораживания компонентов набора.

### 1.4 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 a/b, DYS635

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 5

Оптимальное количество вносимой ДНК: 0,5 нг

Предел чувствительности: 50 пг

### 1.5 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 Ystr, просим незамедлительно связаться с ООО “ГОРДИЗ”.

### 1.6 Сопутствующие материалы

#### Необходимые материалы, не входящие в набор:

Матриксный стандарт CS5 (ООО “ГОРДИЗ”)

Бины и панели для GeneMapper™ (ООО “ГОРДИЗ”, предоставляются бесплатно по запросу).

#### Материалы, поставляемые другими фирмами

Реагент	Производитель	Каталожный номер
Буфер TAPS	ЗАО «СИНТОЛ»	ТАПС
Полимер ПДМА4	ЗАО «СИНТОЛ»	ПДМА-4
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 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 размерный стандарт 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.

Объем вносимого в лунку размерного стандарта S550 может быть снижен до **0.5 мкл** для увеличения возможного количества инъекций. При этом для оптимизации уровня сигнала рекомендуется использовать 1 мкл стандарта S550 для каждого исследуемого препарата. Дополнительный размерный стандарт S550 может быть заказан по каталожному номеру S550-10.

### 2.2 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 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 в течение месяца. Для длительного хранения рекомендуется хранить готовый раствор в замороженном виде. Следует избегать многократной разморозки. Для проведения капиллярного электрофореза необходимо добавить 1 мкл лэддера в смесь формамида и размерного стандарта.

При необходимости количество инъекций аллельной лестницы может быть увеличено путем снижения объема вносимой в лунку аллельной лестницы до **0.5 мкл**.

### 3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

#### 3.1 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

CO<sub>r</sub>DIS Ystr 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 + 5 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (10 мкл деионизированной воды 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 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.**

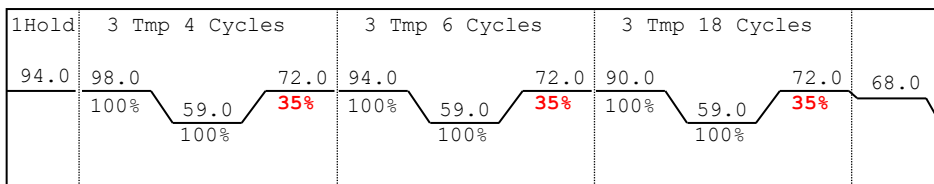
**Параметры ПЦР:**

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.



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

### 4.1 Создание матрикса / спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации CO<sub>r</sub>DIS Ystr 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 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-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_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

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\_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: **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 CO<sub>r</sub>DIS Ystr 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	<b>1700</b>

Нажать **Save As** и ввести удобное название для созданного модуля (например, CO<sub>2</sub>DIS). 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>2</sub> DIS
Type	REGULAR
Run Module*	CO <sub>2</sub> DIS
Dye Set	Any5Dye

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 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<sup>®</sup> Genetic Analyzer.

**Набор CO<sub>r</sub>DIS Ystr не требует температурной денатурации образцов!**

## 4.5 Запуск прибора

### 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_[ <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 / Allelic Ladder / Positive Control / Neg. Control
Size Standard	S550
Panel	CO <sub>r</sub> DIS
Analysis Method	Например, GORDIZ
User-defined 1-3	
SNP Set	
Results Group	Выбрать соответствующий <b>Results Group</b>
Instrument Protocol	Run36_CO <sub>r</sub> DIS

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.

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.

## 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 CO<sub>r</sub>DIS Ystr необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “G5 Template” с использованием матрикс-стандарта CS5.

### 5.1 Создание матрикса / спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации CO<sub>r</sub>DIS Ystr 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 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)**

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

**Setup a Dye Set**

\* Dye Set Name

\* Chemistry

\* Dye Set Template

**Arrange Dyes**

Dye Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Reduced Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Calibration Peak Order	5	4	3	2	1

**Parameters**

The parameters will be used for instruments configured with 36cm capillary array and polymer POP4

Matrix Condition Number Upper Limit

Locate Start Point \* After Scan  \* Before Scan

\* Limit Scans To

Sensitivity

\* Minimum Quality Score



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

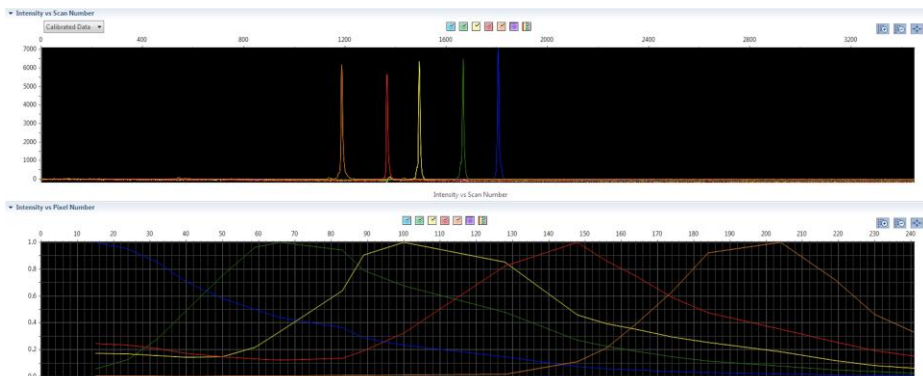
## Шаг В – Проведение спектральной калибровки

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: **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:

<b>Application Type</b>	HID
<b>Dye Set</b>	CS5
<b>Run Module</b>	например “HID36_POP4” (выбрать протокол соответствующий параметрам системы)
<b>Protocol Name</b>	CORDIS YSTR

Рекомендуемые параметры электрофореза для генетического анализатора ABI 3500:

<b>Параметр</b>	<b>Значение</b>
Oven Temperature	60
PreRun Voltage	15
PreRun Time	180
Injection Voltage	1.2
Injection Time	10
Data Delay Time	1
Run Voltage	13.0
Run Time	1600

Нажать кнопку **Save**.

В зависимости от состояния используемого прибора, параметр Injection Time может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала (5–15 sec.).

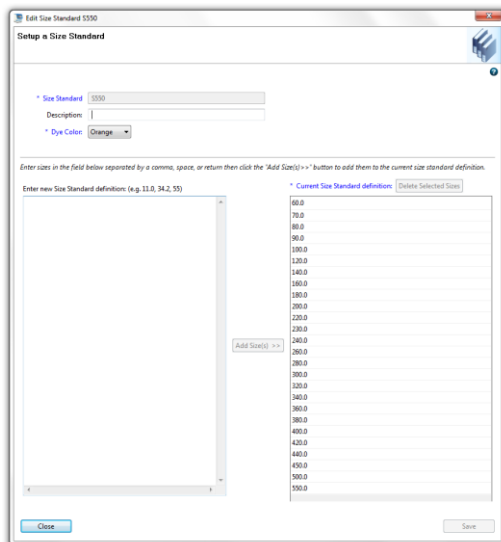
Параметр Run Time также может быть скорректирован пользователем в случае, если рекомендуемое время фореза является избыточным (все фрагменты размерного стандарта детектируются существенно раньше отведенного времени) или недостаточным (не все фрагменты размерного стандарта детектируются за отведенное время).

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

### 5.3 Создание Size Standard

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software**.

В разделе **Analyze**, выбрать вкладку **Size Standards**. В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового **Size Standard**). В появившемся окне указать параметры нового **Size Standard**. 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.

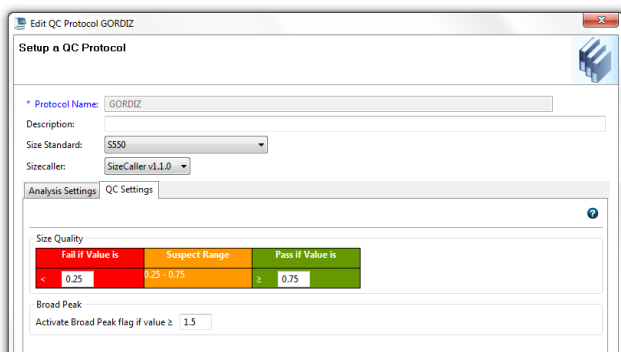
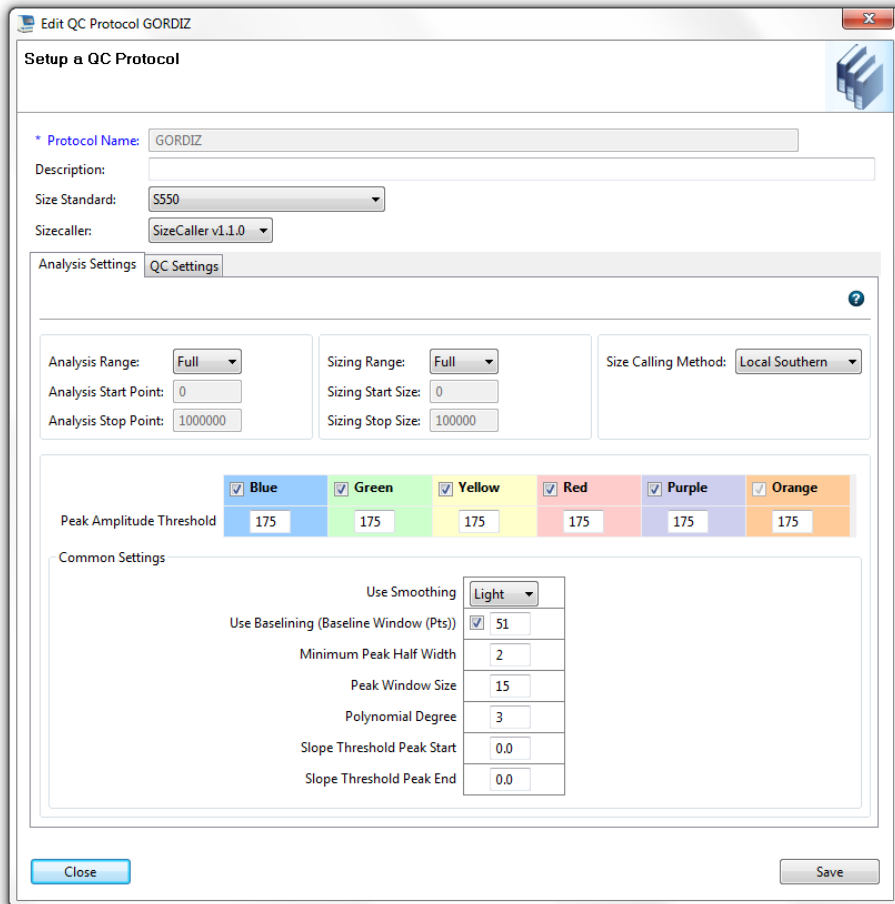


Нажать кнопку **Save**.

### 5.4 Создание QC Protocol

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software**.

В разделе **Analyze**, выбрать вкладку **QC Protocols**. В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового **QC Protocol**). В появившемся окне указать параметры нового **QC Protocol**:



Нажать кнопку **Save**.

## 5.5 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:

<b>Assay Name</b>	CORDIS YSTR
<b>Application Type</b>	HID
<b>Instrument Protocol</b>	CORDIS YSTR

Setup an Assay

Assay Setup Help ?

\* Assay Name: CORDIS YSTR Color: Green

Application Type: HID  Disable Filters

Protocols

Do you wish to assign multiple instrument protocols to this assay?  No  Yes

\* Instrument Protocol: CORDIS YSTR Edit Create New

\* QC Protocol: GORDIZ Edit Create New

Close Save

Нажать кнопку **Save**.

## 5.6 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Для загрузки образцов в прибор необходимо приготовить смесь Ni-Di™ формамида и размерного стандарта S550 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. Накрывать планшет резиновым ковриком и загрузить в прибор в соответствии с инструкцией пользователя ABI PRISM<sup>®</sup> Genetic Analyzer.

**Набор CO<sub>r</sub>DIS Ystr не требует температурной денатурации образцов!**

## 5.7 Запуск прибора

### 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.

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

### Шаг В Заполнение таблицы

Для всех анализируемых лунок планшета необходимо указать

<b>Sample name</b>	имя объекта
<b>Sample type</b>	тип образца
<b>Assay</b>	CORDIS YSTR
<b>Filename convention</b>	структура имени файла
<b>Results group</b>	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**.

## 5.8 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.

## 6. АНАЛИЗ ДАННЫХ

### 6.1 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, 550

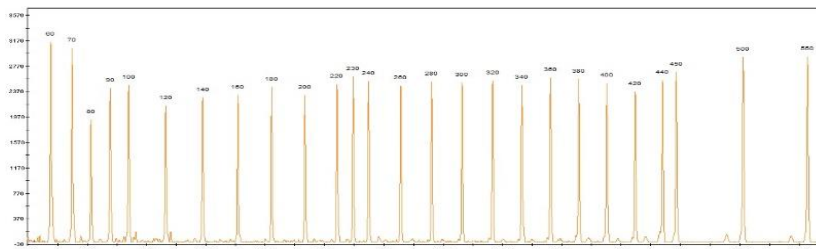


Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550. Размеры фрагментов.

## 6.2 Амплификация контрольной ДНК

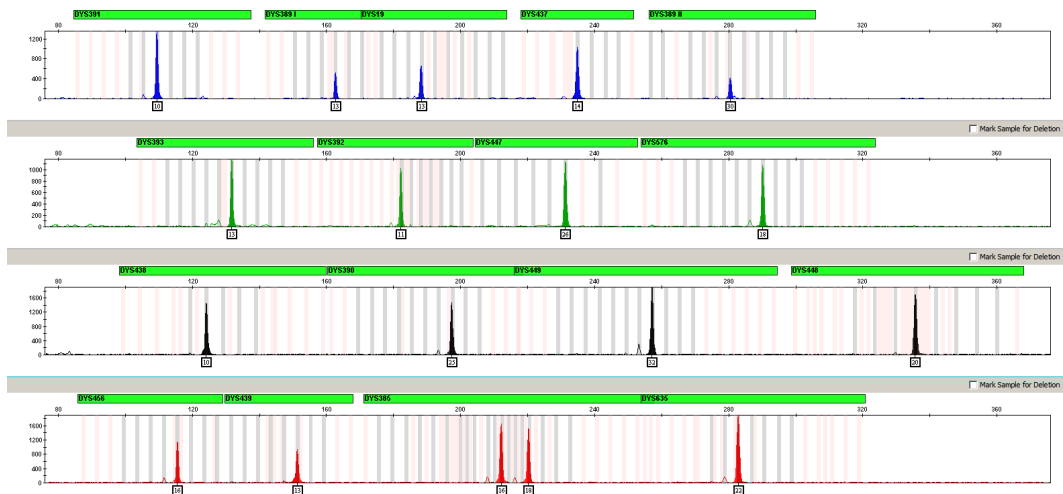


Рисунок 2 Контрольная ДНК МК01 CORDIS Ystr .



### 6.3 Аллельная лестница COrDIS Ystr

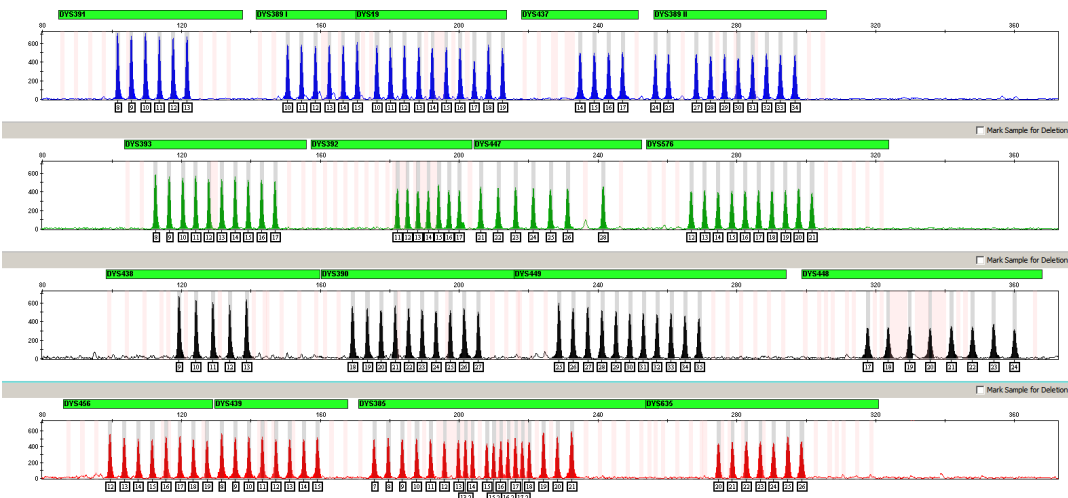


Рисунок 3. Аллельная лестница COrDIS Ystr.

## 7. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель ООО «ГОРДИЗ»

Юридический и почтовый адрес: 143026 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](http://www.gordiz.ru)

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