

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

Инструкция пользователя

Оглавление

1.	ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ	3
1.1	Описание продукта	3
1.2	Компоненты набора и состав	5
1.3	Условия хранения	6
1.4	Основные характеристики набора	7
1.5	Гарантии качества	7
1.6	Сопутствующие материалы	7
2.	РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ	8
2.1	Размерный стандарт S550	8
2.2	Аллельный лэддер	8
3.	ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ	9
3.1	Постановка реакции в 25 мкл	9
3.2	Постановка реакции в 10 мкл	10
3.3	Условия амплификации	11
4.	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130/3130XL	12
4.1	Создание матрикса / спектральная калибровка	12
4.2	Условия капиллярного электрофореза	15
4.3	Создание Instrument Protocol	15
4.4	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	16
4.5	Запуск прибора	17
4.6	Оптимизация интенсивности сигналов	18
5.	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3500/3500XL	18

5.1	Создание матрикса / спектральная калибровка	18
5.2	Создание Instrument Protocol	21
5.3	Создание Size Standard	23
5.4	Создание QC Protocol	24
5.5	Создание Assay	25
5.6	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	25
5.7	Запуск прибора	26
5.8	Оптимизация интенсивности сигнала	27
6.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	28
6.1	Настройка программного обеспечения GeneMapper	28
6.2	Стандарт длины S550	32
6.3	Диапазоны размеров аллелей STR маркеров	33
6.4	Амплификация контрольной ДНК	34
6.5	Аллельная лестница	35
7.	ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	35

История изменений:

Версия документа	Дата	Описание	Раздел
231016	16.10.23	Внесены изменения в протокол приготовления раствора аллельного лэддера	Раздел 2. Разведение сухих компонентов, пункт 2.2
230706	06.07.23	Внесены рекомендации по этапу денатурации ПЦР продуктов	Раздел 4. Электрофорез на анализаторе ABI PRISM 3130/3130XL, пункт 4.4; Раздел 5. Электрофорез на анализаторе ABI PRISM 3500/3500XL, пункт 5.6

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

1.1 Описание продукта

CoRDIS «ЭКСПЕРТ» – набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-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 ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 20-ти локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов <420 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 составляет **25 мкл**. При работе с препаратами ДНК, полученными из образцов сравнения и содержащими заведомо достаточное для исследования количество генетического материала (например, при работе с препаратами ДНК, полученными из образцов буккального эпителия) ПЦР реакция может проводиться в объеме **10 мкл**. Не рекомендуется снижать объем реакции в случае анализа низкокопийных препаратов ДНК, препаратов ДНК содержащих ингибиторы ПЦР, а также препаратов, содержащих деградированный генетический материал.

Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 10 мкл при общем объеме реакции 25 мкл. В случае проведения реакции амплификации в объеме 10 мкл максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 4 мкл.

Набор CoRDIS «ЭКСПЕРТ» может использоваться для создания национальных криминалистических баз данных в странах, использующих в качестве стандартной панели локусов маркеры CODIS (Combined DNA Index System), а также Европейских баз данных на основе ESS (European standard set),

включая страны, использующие SE33 как обязательный маркер. Благодаря максимальному дискриминирующему потенциалу среди доступных на данный момент коммерческих наборов, CO_rDIS «ЭКСПЕРТ» прекрасно подходит для ДНК-идентификации личности, анализа родства (например, экспертизы спорного отцовства), а также для анализа химеризма после пересадки костного мозга.

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® 310/3130/3130XL/3500/3500XL (Applied Biosystems) и Нанофор 05 (Синтол).

Таблица 1. Описание STR-локусов CoRDIS «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 TTTTCTCT[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		Xp22.1-22.3	
Амелогенин Y M55419	Y		Yp11.2	

Таблица 1 Сводная информация о STR-локусах набора CoRDIS «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, 1.0 мл |
| 2. Раствор активатора 5х | 1 пробирка, 1.0 мл |
| 3. Деионизированная вода | 1 пробирка, 1.7 мл |
| 4. Контрольная ДНК МК01 | 1 пробирка, 0.1 нг/мкл |
| 5. Стандарт длины S550 | 2 пробирки, 120 нанесений |
| 6. Аллельная лестница | 1 пробирка, 50 нанесений |

Реакционная смесь представляет 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.

Денионизированная вода предназначена для доведения реакций до рабочего объема.

Контрольная ДНК МК01 представляет собой высокомолекулярную геномную ДНК мужчины в концентрации 0.1 нг/мкл с известным генотипом по всем исследуемым локусам. Предназначена для контроля этапов амплификации, электрофореза и анализа данных.

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, 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. 2.1).

Аллельный лэддер представляет собой лиофилизированную 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. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует добавления воды (п. 2.2).

1.3 Условия хранения

Компоненты набора необходимо хранить при температуре от -15°C до -25°C . После начала использования допускается хранение при температуре от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+8^{\circ}\text{C}$ в течение 1 месяца. Длительное хранение компонентов набора рекомендовано при температуре от -15°C до -25°C .

В соответствии с действующими Техническими Условиями допускается режим транспортировки при температуре не выше +25°C в течении 14 календарных дней.

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: 100 пг

Дискриминирующий потенциал набора: менее 1 из 10²¹

Функциональные характеристики набора CO_rDIS «ЭКСПЕРТ» определены на основании результатов валидационных исследований наборов реагентов согласно международным рекомендациям SWGDAM.

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:

Матриксный стандарт CS5 (ООО «ГОРДИЗ»).

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

Материалы, поставляемые другими производителями:

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 Размерный стандарт S550

Сразу после получения набора необходимо извлечь комплект для электрофореза и хранить отдельно в зоне для работы с ПЦР продуктами в темном месте при температуре +2– +8 °С.

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 готовый раствор допускается хранить при температуре +2– +8 °С в течение месяца. Длительное хранение готового раствора рекомендовано при температуре от -15°С до -25°С. 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 **0.3 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 **50 мкл** деионизированной воды, поставляемой с набором. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки центрифугированием в течение нескольких секунд. После разведения готовый раствор допускается хранить при температуре +2– +8 °С в течение месяца. Длительное хранение готового раствора рекомендовано при температуре от -15°С до -25°С. Для проведения капиллярного электрофореза необходимо добавить 1 мкл лэддера в смесь формамида и размерного стандарта. При недостаточной чувствительности генетического анализатора допускается увеличение объема вносимой в лунку аллельной лестницы до **2 мкл**.

3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

3.1 Постановка реакции в 25 мкл

В каждую пробирку необходимо внести 10 мкл Реакционной смеси, 5 мкл Активатора. Затем внести до 10 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0.2–1 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. При внесении в реакцию амплификации 10 мкл исследуемого препарата, его оптимальная концентрация должна составлять 0.05 нг/мкл.

Компоненты набора	Объем на 1 реакцию
Реакционная смесь	10 мкл
Раствор Активатора 5X	5 мкл
Геномная ДНК (0.2–1 нг)	до 10 мкл
<u>Деионизированная вода, до конечного объема</u>	<u>25 мкл</u>

CO_rDIS «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 + 5 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (10 мкл деионизированной воды вместо ДНК).

3.2 Постановка реакции в 10 мкл

При работе с высококонцентрированными препаратами ДНК, содержащими заведомо пригодный для исследования генетический материал человека (например, препаратами ДНК, полученными из образцов буккального эпителия или иных образцов сравнения), объем реакции может быть сокращен до 10 мкл.

В каждую пробирку необходимо внести 4 мкл Реакционной смеси, 2 мкл Активатора. Затем внести до 4 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0.2–1 нг. Оптимальное количество вносимой ДНК – **0.4 нг**. Вносимый объем ДНК зависит от концентрации исследуемого препарата. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет **4 мкл**. При необходимости довести общий объем реакции до 10 мкл деионизированной водой, поставляемой в составе набора. При внесении в реакцию амплификации 4 мкл исследуемого препарата, его оптимальная концентрация должна составлять 0.1 нг/мкл.

Компоненты набора	Объем на 1 реакцию
Реакционная смесь	4 мкл
Раствор Активатора 5X	2 мкл
Геномная ДНК (0.2–0.1 нг)	до 4 мкл
Деионизированная вода, до конечного объема	10 мкл

CoRDIS «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** (4 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (4 мкл деионизированной воды вместо ДНК).

3.3 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.**

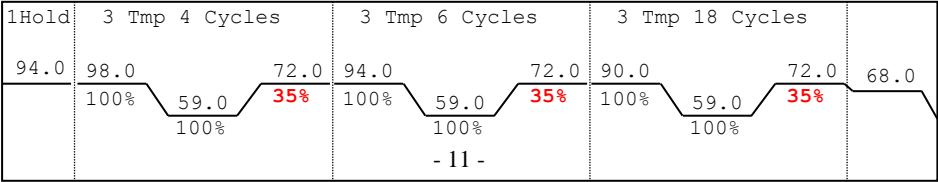
Параметры ПЦР:

94°C	3 мин	
98°C	30 сек	
59°C	2 мин	4 цикла
72°C*	1 мин 30 сек	
94°C	30 сек	
59°C	2 мин	6 циклов
72°C*	1 мин 30 сек	
90°C	30 сек	
59°C	2 мин	18 циклов
72°C*	1 мин 15 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 моделях амплификаторов 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 амплификаторов GeneAmp 9700, в режиме эмуляции GeneAmp 9600. Включение режима эмуляции скорости нагрева GeneAmp 9600 является обязательным условием для корректной работы программы амплификации на приборах GeneAmp 9700.



При работе с низкокопийными препаратами ДНК (<0.1 нг ДНК) можно повысить чувствительность реакции добавив 2–4 дополнительных цикла ПЦР в последний блок программы. Не рекомендуется превышать суммарно 34 цикла амплификации. В этом случае возрастает опасность ошибки вследствие выпадения аллелей и дисбаланса гетерозигот.

После завершения программы амплификации ПЦР 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_rDIS «ЭКСПЕРТ» необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “Any5Dye” с использованием матрикс-стандарта CS5.

4.1 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 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 длительного хранения рекомендуется заморозка при -15°C – -25°C.

При проведении спектральной калибровки **настоятельно рекомендуется** использовать только чистые септы, новый 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 **OK** 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 не более 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 **ОК**. Нужно иметь в виду, что для каждого набора виртуальных фильтров (**dye set**) последняя калибровка автоматически становится активной. Если планируется использовать результаты предыдущих калибровок, их необходимо активировать до запуска прибора.

4.2 Условия капиллярного электрофореза

Перед проведением первого анализа продуктов амплификации CO_rDIS «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	1.2
Injection Time	10
Voltage Number of Steps	40
Voltage Step Interval	15
Data Delay Time	1
Run Voltage	13.0
Run Time	1700

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 форе́за является избыточным (все фрагменты размерного стандарта детектируются существенно раньше отведенного времени) или недостаточным (не все фрагменты размерного стандарта детектируются за отведенное время). Оптимальное время форе́за в наибольшей степени зависит от текущего состояния капилляров и полимера в генетическом анализаторе и может меняться со временем.

Нажать **Save As** и ввести удобное название для созданного модуля (например, CO_rDIS). 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_CoRDIS
Type	REGULAR
Run Module	CoRDIS
Dye Set	Any5Dye

Нажать кнопку **ОК** 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 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 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 ABI PRISM® Genetic Analyzer.

При проведении реакции амплификации в объеме 10 мкл (при исследовании образцов сравнения) один набор реагентов CoRDIS «ЭКСПЕРТ» позволяет провести исследование 500 образцов. В состав набора входит

аллельная лестница, рассчитанная на проведение 20 инъекций (при нанесении 1 мкл аллельной лестницы в лунку планшета). При необходимости количество инъекций аллельной лестницы может быть увеличено путем снижения объема вносимой в лунку аллельной лестницы до 0.5 мкл (без потери качества анализа). Объем вносимого в лунку размерного стандарта S550 также 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.

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, Run Module, и Instrument Protocol.

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 COrDIS_[data]
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	COrDIS
Analysis Method	Например, GORDIZ
User-defined 1-3 SNP Set	

Results Group	Выбрать соответствующий Results Group
Instrument Protocol	Run36_CO _r 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 сигнала возможно увеличение времени инъекции. Усиление сигнала также возможно с помощью очистки ПЦР-продукта от праймеров и солей. Количество размерного стандарта в этом случае следует так же уменьшить.

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_rDIS «ЭКСПЕРТ» необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “CS5”.

5.1 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 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 длительного хранения рекомендуется заморозка при -15°C – -25°C.

При проведении спектральной калибровки **настоятельно рекомендуется** использовать только чистые септы, новый буферный раствор и воду. Использование ранее использованных септ при проведении спектральной калибровки может приводить к попаданию ранее исследованных меченных ПЦР продуктов в область анализа, 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**Upper limit****Minimal Quality Score** 0.8

The screenshot shows the 'Edit Dye Set GORDIZ' window. The 'Setup a Dye Set' section includes fields for 'Dye Set Name' (CS5), 'Chemistry' (Matrix Standard), and 'Dye Set Template' (G5 Template). Below this is the 'Arrange Dyes' section with a table for dye selection and calibration peak order. The 'Parameters' section contains various settings for instrument configuration.

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

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

Matrix Condition Number Upper Limit: 20

Locate Start Point: * After Scan: 500, * Before Scan: 5000

* Limit Scans To: 2500

Sensitivity: 0.4

* Minimum Quality Score: 0.8

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

Шаг В – Проведение спектральной калибровки

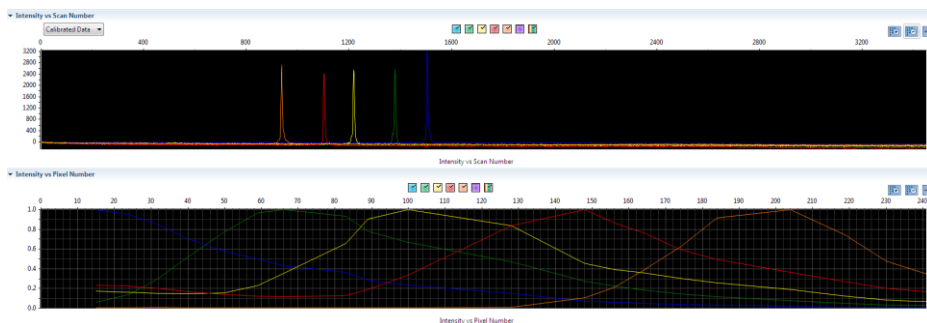
Перейти в раздел **Maintenance** в программе **Data Collection Software**. В разделе **Calibrate**, выбрать вкладку **Spectral Calibration**. В открывшемся окне выбрать количество лунок в используемом планшете (**Number of Wells**) и позицию планшета в приборе (**Plate Position**). В пункте **Chemistry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

При проведении спектральной калибровки **настоятельно рекомендуется** использовать только чистые септы, новый буферный раствор и воду.

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:

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

GORDIZ - Edit Instrument Protocol GORDIZ

Setup an Instrument Protocol

Instrument Protocol Setup Help

Application Type: Capillary Length: cm Polymer:

Dye Set: ☐ Disable Name Filter

Instrument Protocol Properties

* Run Module: Run Modules for 8 capillary are only available in the list.

* Protocol Name:

Description:

Oven Temperature (°C): Run Voltage (kVolts): PreRun Voltage (kVolts): Injection Voltage (kVolts):

Run Time (sec.): PreRun Time (sec.): Injection Time (sec.): Data Delay (sec.):

▼ Advanced Options

Following values are not recommended to be changed.

Voltage Tolerance (kVolts): Voltage # of Steps (nk): Voltage Step Interval (sec.):

First Read Out Time (ms): Second Read Out Time (ms):

Normalization Target: Normalization Factor Threshold Min: Normalization Factor Threshold Max:

Рекомендуемые параметры электрофореза для генетического анализатора ABI 3500:

Параметр	Значение
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	1700

Нажать кнопку **Save**.

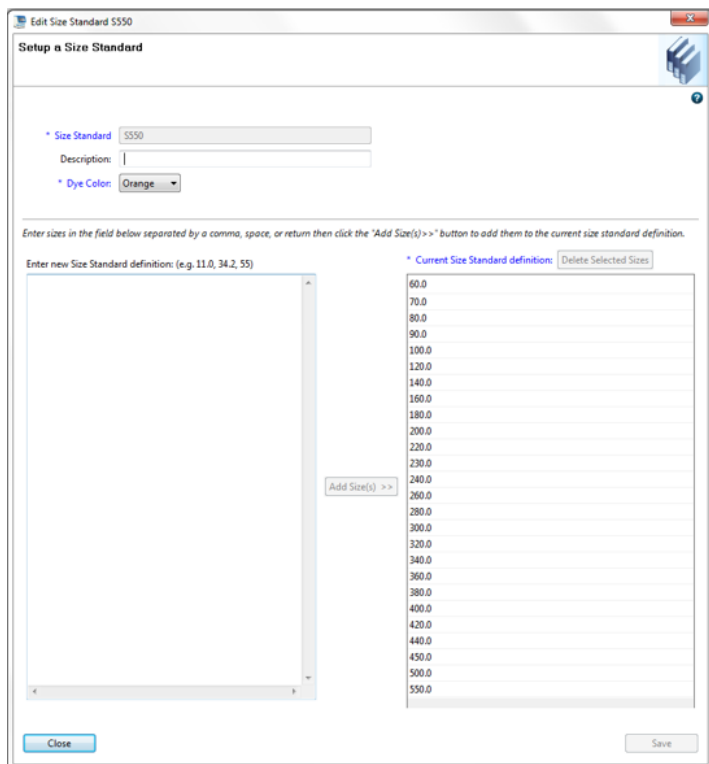
В зависимости от состояния используемого прибора, параметр Injection Time может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала. Параметр Run Time также может быть скорректирован пользователем в случае, если рекомендуемое время фореа является избыточным (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.

5.3 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**:

Close Save

Fail if Value is	Suspect Range	Pass if Value is
0.25	0.25 - 0.75	0.75

Broad Peak
Activate Broad Peak flag if value >= 1.5

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:

Assay Name	CoRDIS EXPERT
Application Type	HID
Instrument Protocol	CoRDIS EXPERT

Нажать кнопку **Save**.

5.6 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Для загрузки образцов в прибор необходимо приготовить смесь Hi-Di™ формамида и размерного стандарта S550 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на один образец
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1 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 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 ABI PRISM[®] Genetic Analyzer.

При проведении реакции амплификации в объеме 10 мкл (при исследовании образцов сравнения) один набор реагентов CO₂DIS «ЭКСПЕРТ» позволяет провести исследование 500 образцов. В состав набора входит аллельная лестница, рассчитанная на проведение 20 инъекций (при нанесении 1 мкл аллельной лестницы в лунку планшета). При необходимости количество инъекций аллельной лестницы может быть увеличено путем снижения объема вносимой в лунку аллельной лестницы до 0.5 мкл. Объем вносимого в лунку размерного стандарта S550 также может быть снижен до 0.3 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.

5.7 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, Instrument Protocol и Assay.

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	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	CORDIS EXPERT
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**.

5.8 Оптимизация интенсивности сигнала

Для повышения интенсивности сигнала возможно увеличение времени инъекции. Усиление сигнала также возможно 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 рекомендованных 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 Настройка программного обеспечения GeneMapper

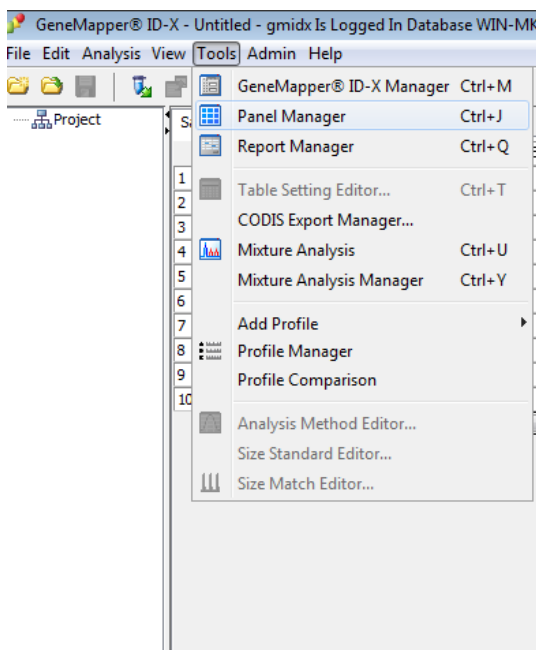
Полученные данные могут быть проанализированы с использованием программного обеспечения GeneMapper ID и GeneMapper ID-X.

Программное обеспечение GeneMapper требует предварительной настройки параметров анализа. Параметры анализа для наборов CoRDIS могут быть импортированы в программу из файлов настроек, предоставляемых производителем по запросу.

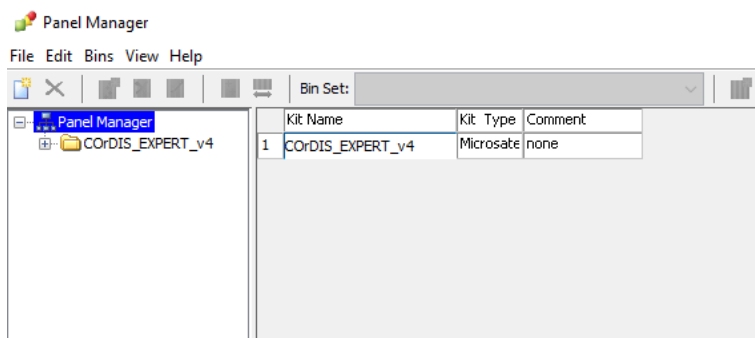
Для анализа результатов электрофореза с использованием программного обеспечения GeneMapper необходимо произвести следующие действия:

- 1) Произвести импорт файлов панелей и бинов.

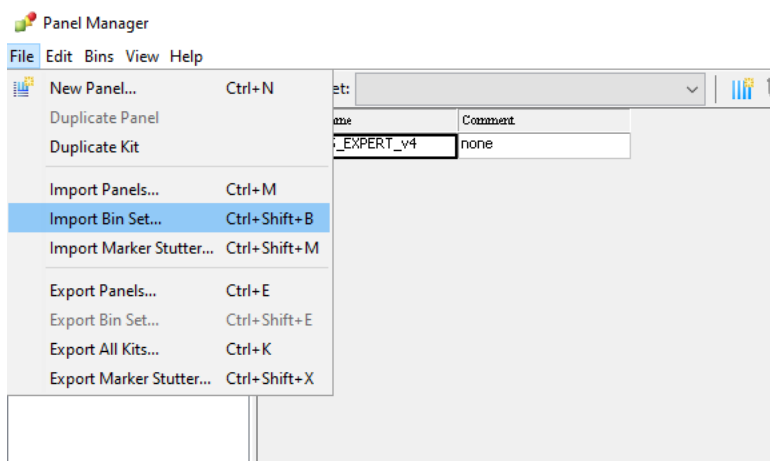
Выбрать пункт меню Tools-> Panel Manager.



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



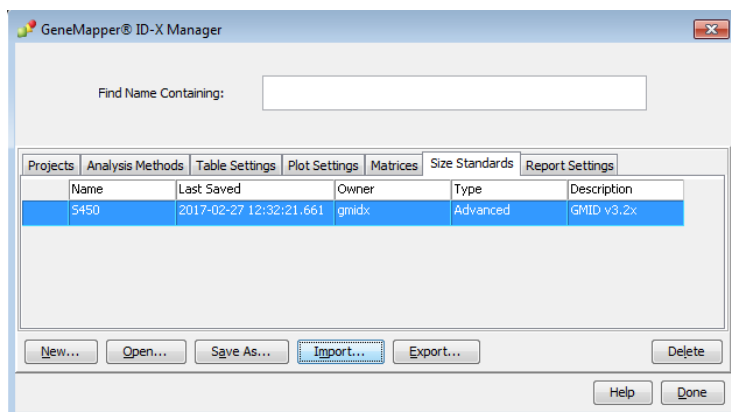
Затем в меню выбрать File-> Import panels.



В открывшемся окне найти и выбрать файл с панелями (Например, файл EXPERT_Panels). Загрузить нажатием кнопки Import. В левом верхнем сегменте окна выбрать загруженную панель (Например, EXPERT), затем в меню выбрать File-> Import bin set. В открывшемся окне найти и выбрать файл с бинами (Например, файл EXPERT_bins). Загрузить нажатием кнопки Import. Нажать кнопки Apply и OK.

2) Произвести импорт настроек размерного стандарта.

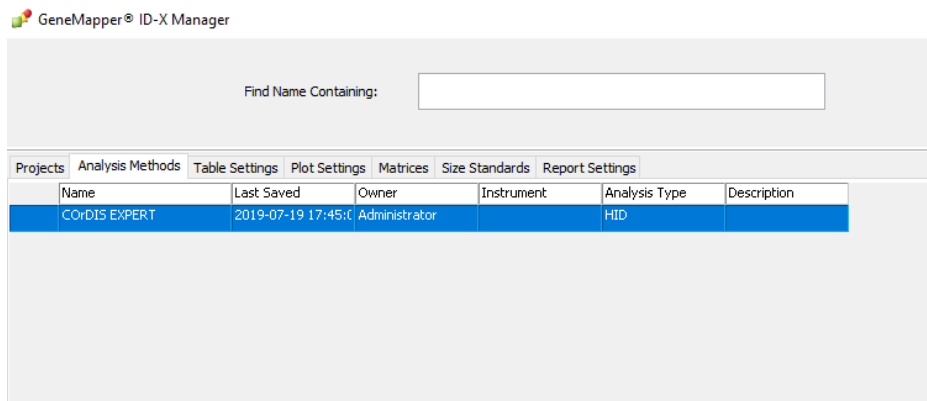
Выбрать пункт меню Tools> GeneMapper Manager. В открывшемся окне выбрать вкладку Size Standards



Загрузить файл настроек размерного стандарта нажатием кнопки Import. Нажать кнопку Done.

3) Создать новый метод анализа.

Выбрать пункт меню Tools -> GeneMapper Manager. В открывшемся окне выбрать вкладку Analysis Methods.



Создать новый метод анализа нажатием кнопки New.

Присвоить имя новому методу анализа. Например, CORDIS EXPERT.

Analysis Method Editor

General Allele Peak Detector Peak Quality SQ & GQ Settings

Analysis Method Description

Name: CORDIS EXPERT

Security Group: Databasing Security Group

Description:

Instrument:

Analysis Type: HID

Во вкладке Allele выбрать соответствующий набор бинов.

Analysis Method Editor

General Allele Peak Detector Peak Quality SQ & GQ Settings

Bin Set: CORDIS_EXPERT_v4

☒ Use marker-specific stutter ratio and distance if available

Marker Repeat Type:	Tri	Tetra	Penta	Hexa
Global Cut-off Value	0.2	0.2	0.2	0.2
MinusA Ratio	0.0	0.3	0.0	0.0
MinusA Distance	From 0.0	0.0	0.0	0.0
	To 0.0	0.0	0.0	0.0
Global Minus Stutter Ratio	0.0	0.0	0.0	0.0
Global Minus Stutter Distance	From 0.0	3.25	0.0	0.0
	To 0.0	4.75	0.0	0.0
Global Plus Stutter Ratio	0.0	0.0	0.0	0.0
Global Plus Stutter Distance	From 0.0	0.0	0.0	0.0
	To 0.0	0.0	0.0	0.0

Amelogenin Cutoff 0.0

Range Filter... Factory Defaults

Save As Save Cancel Help

Провести настройку параметров анализа во вкладке Peak Detector: установить значение параметра Peak Window Size равным 9, отключить нормализацию сигнала (Use Normalisation, if applicable).

Analysis Method Editor ✕

General Allele **Peak Detector** Peak Quality SQ & GQ Settings

Peak Detection Algorithm: Advanced

Ranges

Analysis
Full Range

Sizing
All Sizes

Start Pt: 0
Stop Pt: 10000

Start Size: 0
Stop Size: 1000

Smoothing and Baselineing

Smoothing
☐ None
☒ Light
☐ Heavy

Baseline Window: 51 pts

Size Calling Method
☐ 2nd Order Least Squares
☐ 3rd Order Least Squares
☐ Cubic Spline Interpolation
☒ Local Southern Method
☐ Global Southern Method

Peak Detection

Peak Amplitude Thresholds:

B: 50 R: 50
G: 50 P: 50
Y: 50 O: 50

Min. Peak Half Width: 2 pts
Polynomial Degree: 3
Peak Window Size: 9 pts

Slope Threshold

Peak Start: 0.0
Peak End: 0.0

Normalization

☐ Use Normalization, if applicable

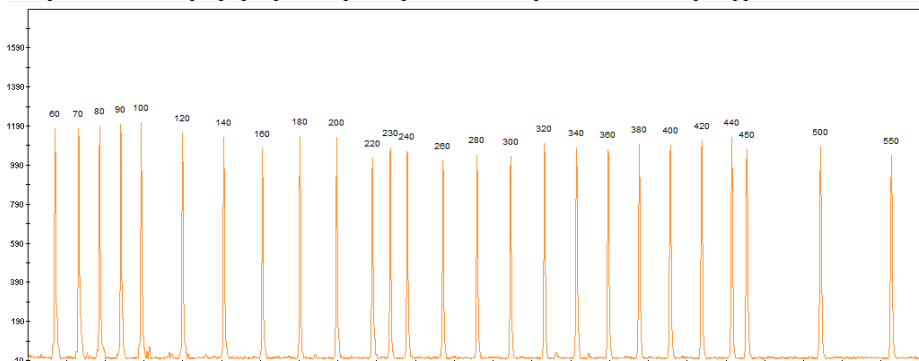
Factory Defaults

Save As Save Cancel Help

Сохранить изменения.

6.2 Стандарт длины S550

Ниже приводится пример электрофореграммы с сигналами фрагментов стандарта 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.

6.3 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.

6.4 Амплификация контрольной ДНК

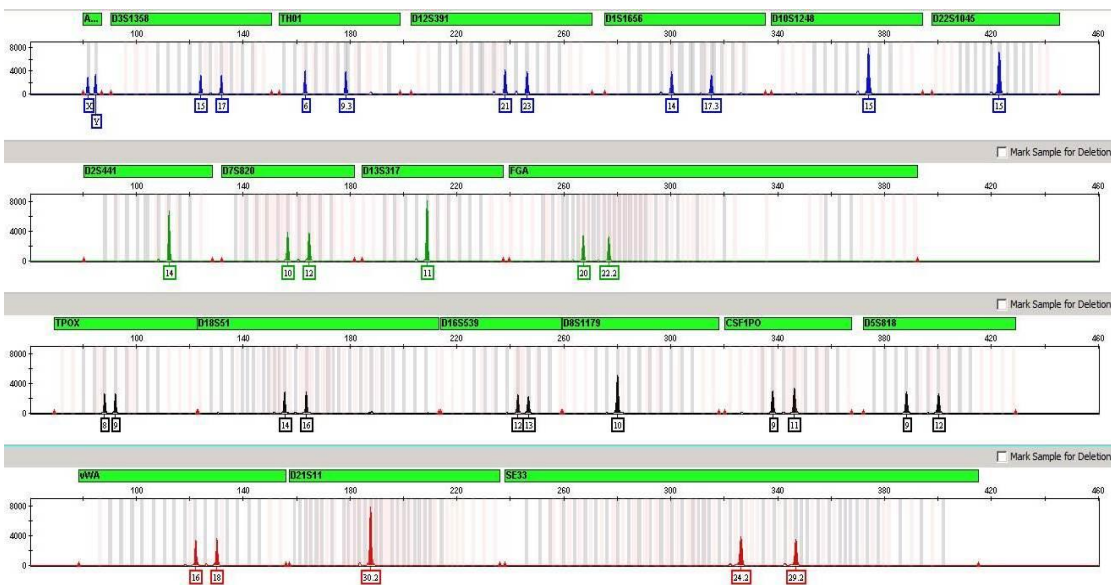


Рисунок 2 Контрольная ДНК МК01

6.5 Аллельная лестница

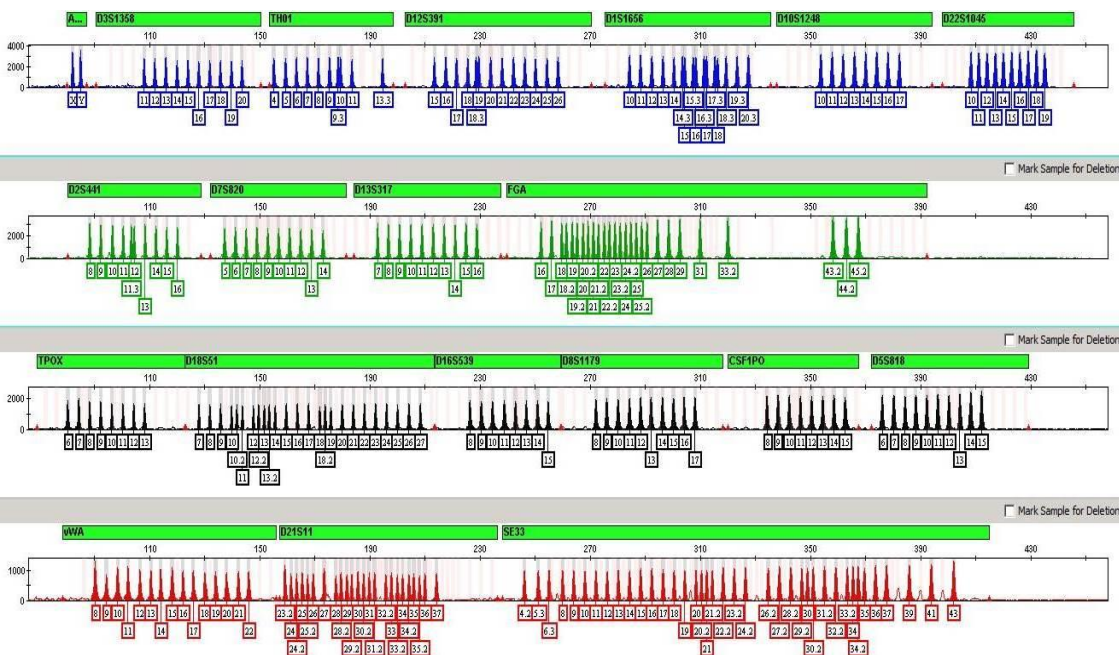


Рисунок 3. Аллельная лестница COrDIS «ЭКСПЕРТ».

7. 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