



## Набор реагентов для мультиплексного анализа 26-ти индивидуализирующих маркеров ДНК 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	5
1.3	Условия хранения	6
1.4	Основные характеристики набора	6
1.5	Гарантии качества	6
1.6	Сопутствующие материалы	7
<b>2.</b>	<b>РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ</b>	<b>7</b>
2.1	Размерный стандарт S550	7
2.2	Аллельная лестница	8
3.1	Постановка реакции в 25 мкл	8
3.2	Постановка реакции в 10 мкл	9
3.3	Постановка реакции с материалом на картах-носителях в 25 мкл	9
3.4	Постановка реакции с материалом на картах-носителях в 10 мкл	10
3.5	Постановка реакции с образцами цельной крови	11
3.6	Стандартная программа амплификации	12
<b>4.</b>	<b>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3500/3500XL</b>	<b>13</b>
4.1	Создание матрикса / спектральная калибровка	13
4.2	Создание Instrument Protocol	16
4.4	Создание QC Protocol	18
4.5	Создание Assay	20
4.6	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	20
4.7	Запуск прибора	21
<b>5.</b>	<b>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ «НАНОФОР 05»</b>	<b>22</b>

5.1	Спектральная калибровка	22
5.2	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	28
5.3	Создание проекта	29
5.4	Запуск анализа проекта	33
<b>6.</b>	<b>АНАЛИЗ ДАННЫХ</b>	<b>34</b>
6.1	Настройка программного обеспечения GeneMapper	34
6.2	Стандарт длины S550	38
6.3	Диапазоны размеров аллелей исследуемых локусов	39
6.4	Амплификация контрольной ДНК	40
6.5	Аллельная лестница	41
<b>7.</b>	<b>ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ</b>	<b>42</b>

## 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

### 1.1 Описание продукта

CoRDIS «ЭКСПЕРТ 26» – набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 26-ти высоко полиморфных локусов геномной ДНК человека: AMEL, SRY, D3S1358, TH01, D12S391, D5S818, TPOX, Yindel, D2S441, D7S820, D13S317, FGA, D22S1045, D18S51, D16S539, D8S1179, CSF1PO, D6S1043, vWA, D21S11, SE33, D10S1248, D1S1656, D19S433, D2S1338, DYS391.

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 пятью флуоресцентными красителями, детектируемыми в каналах *Blue, Green, Yellow, Red, Purple*. Стандарт длины S550 мечен шестым флуоресцентным красителем и детектируется в отдельном канале *Orange* одновременно с продуктами ПЦР.

Для получения полного STR-профиля образца достаточно 0.1 нанограмм недеградированной ДНК. При этом набор реагентов CoRDIS «ЭКСПЕРТ 26» позволяет амплифицировать генетический материал в широком динамическом диапазоне концентраций ДНК. Данный эффект достигается благодаря уникальной технологии нормирования сигнала целевого продукта реакции амплификации (технология нормирующей амплификации CoRDIS STRICT). Исследование препаратов ДНК может проводиться без предварительной оценки и нормирования концентрации ДНК. Вне зависимости от количества исходной ДНК, вносимой в реакцию, финальное количество целевых ПЦР продуктов всегда

находится на одном и том же уровне (оптимальном для проведения дальнейшего электрофоретического исследования).

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 15 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 6 мкл.

Набор CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26» может использоваться для создания национальных криминалистических баз данных в странах, использующих в качестве стандартной панели локусов маркеры CODIS (Combined DNA Index System), EXPANDED CODIS (Expanded Combined DNA Index System) а также Европейских баз данных на основе ESS (European standard set), включая страны, использующие SE33 как обязательный маркер. Набор CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26» 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 , SimpliAmp™ Thermal Cycler, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler.

Анализ ПЦР-продуктов может проводиться с использованием генетических анализаторов ABI PRISM® 3130/3130XL/3500/3500XL (Applied Biosystems), Нанофор 05 (СИНТОЛ).

**Таблица 1. Описание STR-локусов CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26»**

Маркер	Реф. номер GenBank®	Реф. аллель GenBank®	Хромосомная локализация	Структура единицы повтора реф. аллеля
D1S1656	NC_000001.9	17	1q42	[TAGA] <sub>16</sub> [TGA][TAGA][TAGG] <sub>1</sub> [TG] <sub>5</sub>
D2S441	AL079112	12	2p14	[TCTA] <sub>12</sub>
D3S1358	NT_005997	18	3p21.31	TCTA [TCTG] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>15</sub>
D5S818	AC008512	11	5q23.2	[AGAT] <sub>11</sub>
D7S820	AC004848	13	7q21.11	[GATA] <sub>13</sub>
D8S1179	AF216671	13	8q24.13	[TCTA] <sub>3</sub>
D10S1248	AL391869	13	10q26.3	[GGAA] <sub>13</sub>
D12S391	G08921	19.3	12p13.2	[AGAT] <sub>5</sub> GAT[AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT
D13S317	AL353628	11	13q31.1	[TATC] <sub>11</sub>
D16S539	AC024591	11	16q24.1	[GATA] <sub>11</sub>
D18S51	AP001534	18	18q21.33	[AGAA] <sub>18</sub>
D21S11	AP000433	29	21q21.1	[TCTA] <sub>4</sub> [TCTG] <sub>6</sub> [TCTA] <sub>3</sub> TA[TCTA] <sub>3</sub> TCA [TCTA] <sub>2</sub> TCCATA [TCTA] <sub>11</sub>
D22S1045	AL022314	17	22q12.3	[ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub>
CSF1PO	X14720	12	5q33.1	[AGAT] <sub>12</sub>
FGA	M64982	21	4q31.3	[TTTC] <sub>3</sub> TTTTTTCT[CTTT] <sub>13</sub> CTCC[TTCC] <sub>2</sub>
SE33	V00481	26.2	6q14	[AAAG] <sub>8</sub> AA [AAAG] <sub>17</sub>
TH01	D00269	9	11p15.5	[TCAT] <sub>9</sub>
TPOX	M68651	11	2p25.3	[AATG] <sub>11</sub>
VWA	M25858	18	12p13.31	TCTA [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>13</sub>
D6S1043	NT_007299	12	6q15	[AGAT] <sub>9,25</sub>
D19S433	AC008507.6	14	19q12	(AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG) [AAGG] <sub>n</sub>
D2S1338	AC010136	23	2q35	[TGCC] <sub>n</sub> [TTCC] <sub>n</sub>
DYS391	AC011302	11	Y	[TCTA] <sub>n</sub>
Amel X	M55418	X	Xp22.1-22.3	
Amel Y	M55419	Y	Yp11.2	
SRY	MH972533	SRY	Yp11.2	
Yindel	M175	2	Yq11.221	

**Таблица 1** Сводная информация о локусах ДНК, присутствующих в составе набора CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26». Для STR-локусов 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

### Набор реагентов Эксперт 26, 200 реакций (каталожный номер E26-200)

1. Пробирка с реакционной смесью	1 пробирка (1 мл)
2. Раствор активатора	1 пробирка (1 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 (по 120 нанесений)
6. Аллельная лестница	1 пробирка (50 нанесений)

### Набор реагентов Эксперт 26, 1000 реакций (каталожный номер E26-1000)

1. Пробирка с реакционной смесью	5 пробирок (1 мл)
2. Раствор активатора	5 пробирок (1 мл)
3. Деионизированная вода	5 пробирок (1.7 мл)
4. Контрольная ДНК МК01	1 пробирка (0.1 нг/мкл)
5. Стандарт длины S550	10 пробирок (по 120 нанесений)
6. Аллельная лестница	2 пробирки (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.

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

**Контрольная ДНК МК01** представляет собой 10 нг высокомолекулярной геномной ДНК мужчины в концентрации 0.1 нг/мкл с известным генотипом по всем исследуемым локусам (стр. 38, рис. 2). 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).

**Аллельная лестница** 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°C до +8°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 – 26;

Список одновременно анализируемых локусов:

AMEL, SRY, D3S1358, TH01, D12S391, D5S818, TPOX, Yindel, D2S441, D7S820, D13S317, FGA, D22S1045, D18S51, D16S539, D8S1179, CSF1PO, D6S1043, vWA, D21S11, SE33, D10S1248, D1S1656, D19S433, D2S1338, DYS391

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 6

Оптимальное количество вносимой ДНК (в реакцию): 0.2–200 нг

Предел чувствительности: 0.1 нг (в реакцию)

Функциональные характеристики набора COrDIS «ЭКСПЕРТ 26» 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 COrDIS «ЭКСПЕРТ 26», просим незамедлительно связаться с ООО «ГОРДИЗ».

## 1.6 Сопутствующие материалы

### Необходимые материалы, не входящие в набор:

Матриксный стандарт CS6 (ООО «ГОРДИЗ»)

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

### Материалы, поставляемые другими производителями:

Реагент	Производитель	Каталожный номер
10-кратный буфер «ТАПС»	ООО «НПФ Синтол»	ПД-0407
Полимер «ПДМА-4»	ООО «НПФ Синтол»	БТС-0050
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 Аллельная лестница

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. СТАНДАРТНЫЕ ПРОТОКОЛЫ АМПЛИФИКАЦИИ

### 3.1 Постановка реакции в 25 мкл

Набор реагентов CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26» позволяет проводить амплификацию в широком диапазоне значений концентрации исследуемых препаратов. Так как в норме концентрация препаратов ДНК редко превышает 200 нг/мкл, предварительное определение точного значения концентрации ДНК в исследуемых препаратах не требуется.

В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Реакционной смеси, 5 мкл Активатора. Затем внести до 15 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0.2–200 нг. При необходимости общий объем реакции довести до 25 мкл деионизированной водой, поставляемой в составе набора.

Компоненты набора	Объем на 1 реакцию
Реакционная смесь	5 мкл
Раствор Активатора	5 мкл
Геномная ДНК (0.2–200 нг)	до 15 мкл
Деионизированная вода, до конечного объема	25 мкл

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** (15 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (15 мкл деионизированной воды вместо ДНК).



### 3.2 Постановка реакции в 10 мкл

Протокол предназначен для работы с высококонцентрированными препаратами ДНК, содержащими заведомо пригодный для исследования генетический материал человека (например, препаратами ДНК, полученными из образцов буккального эпителия или иных образцов сравнения). Не рекомендуется снижать объем реакции в случае анализа низкокопийных препаратов ДНК, препаратов ДНК содержащих ингибиторы ПЦР, а также препаратов, содержащих деградированный генетический материал.

В каждую пробирку необходимо внести 2 мкл Реакционной смеси, 2 мкл Активатора. Затем внести до 6 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0.2–200 нг.

<b>Компоненты набора</b>	<b>Объем на 1 реакцию</b>
Реакционная смесь	2 мкл
Раствор Активатора	2 мкл
Геномная ДНК (0.2–200 нг)	до 6 мкл
<u>Деионизированная вода, до конечного объема</u>	<u>10 мкл</u>

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** (6 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (6 мкл деионизированной воды вместо ДНК).

### 3.3 Постановка реакции с материалом на картах-носителях в 25 мкл

Набор реагентов COrDIS «ЭКСПЕРТ 26» позволяет проводить амплификацию материала с карт-носителей (например FTA).

При исследовании биоматериала на целлюлозных картах-носителях в каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Реакционной смеси, 5 мкл Активатора и 15 мкл деионизированной воды, поставляемой в составе набора. Затем внести в пробирку 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.

<b>Компоненты набора</b>	<b>Объем на 1 реакцию</b>
Реакционная смесь	5 мкл
Раствор Активатора	5 мкл
<u>Деионизированная вода, до конечного объема</u>	<u>15 мкл</u>

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** (15 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (15 мкл деионизированной воды вместо ДНК).

### 3.4 Постановка реакции с материалом на картах-носителях в 10 мкл

При исследовании биоматериала на целлюлозных картах-носителях в каждую пробирку необходимо внести 2 мкл Реакционной смеси, 2 мкл Активатора и 6 мкл деионизированной воды, поставляемой в составе набора. Затем внести в пробирку 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.

<b>Компоненты набора</b>	<b>Объем на 1 реакцию</b>
Реакционная смесь	2 мкл
Раствор Активатора	2 мкл
<u>Деионизированная вода, до конечного объема</u>	<u>6 мкл</u>

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** (6 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (6 мкл деионизированной воды вместо ДНК).

### 3.5 Постановка реакции с образцами цельной крови

Протокол предназначен для работы с образцами цельной крови (необходимо учесть, что забор образцов цельной крови должен производиться в пробирку с ЭДТА).

Для постановки реакции с образцами цельной крови необходимо подготовить разведения образцов крови в стандартном буфере ТЕ по схеме:

#### Подготовка препаратов крови

Цельная кровь 2 мкл

Стандартный буфер ТЕ 60 мкл

В каждую пробирку необходимо внести 2 мкл Реакционной смеси, 2 мкл Активатора. Затем внести 6 мкл предварительно подготовленных препаратов крови.

<u>Компоненты набора</u>	<u>Объем на 1 реакцию</u>
Реакционная смесь	2 мкл
Раствор Активатора	2 мкл
Подготовленный препарат крови	6 мкл
<b>Конечный объем реакции</b>	<b>10 мкл</b>

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** (6 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (6 мкл деионизированной воды вместо крови).

### 3.6 Стандартная программа амплификации

Приведенные ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных и применимы при работе по стандартному протоколу. Изменение количества циклов амплификации недопустимо.

#### Параметры ПЦР:

---

94°C	2 мин	
96°C	5 сек	
60°C	30 сек	28 циклов
72°C	30 сек	
96°C	5 сек	
62°C	30 сек	5 циклов
72°C	30 сек	
68°C	15 мин	
15°C	∞	

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 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 флуоресцентных меток CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26» необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “CS6”, который должен быть создан пользователем в соответствии с пунктом 4.1 и откалиброван с использованием матрикс-стандарта CS6.

##### 4.1 Создание матрикса / спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26» на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 6-ти цветным матрикс-стандартом CS6 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру CS6). Матрикс-стандарт содержит смесь 6-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 CS6 добавить 50 мкл деионизированной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS6 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, 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)

Hi-Di™ формамид	80 мкл
Раствор CS6	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-DiTM формамид                      240 мкл  
Раствор CS6                                24 мкл

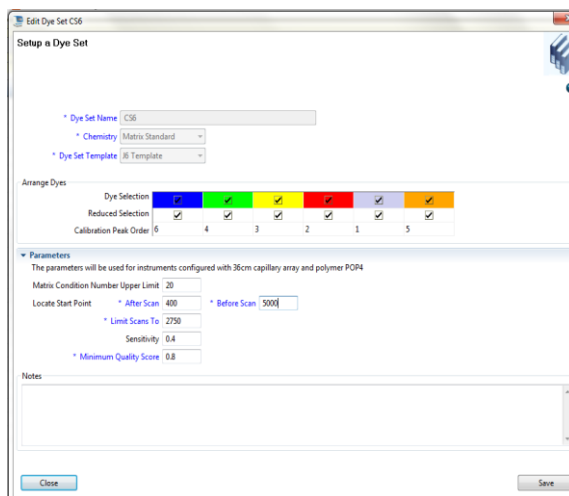
Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01- H03 96-луночного планшета.  
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

### 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**                      CS6  
**Chemistry**                         Matrix standard  
**Dye Set Template**                J6 Template  
**Arrange Dyes**                    оставить без изменений  
**Parameters:**  
**Matrix condition number**        20  
**Upper limit**  
**Minimal Quality Score**          0.8



Нажать кнопку **Save**. Новый Dye Set (CS6) появится в списке.

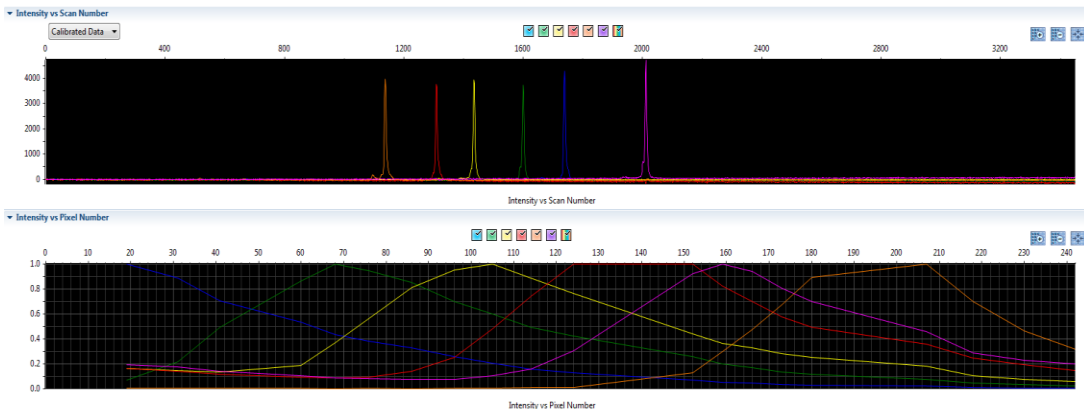
## Шаг В – Проведение спектральной калибровки

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 **CS6**. 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 CS6 в качестве матричного стандарта, в окне профиля калибровки (**Intensity vs Pixel Number**) должна отражаться следующая последовательность пиков.



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

## 4.2 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>	CS6
<b>Run Module</b>	например "HID36_POP4" (выбрать протокол соответствующий параметрам системы)
<b>Protocol Name</b>	EXPERT 26

Instrument Protocol Setup Help ?

Application Type: HID Capillary Length: 36 cm Polymer: POP4

Dye Set: CS6 ☐ Disable Name Filter

Instrument Protocol Properties

\* Run Module: HID36\_POP4 Run Modules for 8 capillary are only available in the list.

\* Protocol Name: EXPERT26

Description:

Oven Temperature (°C): 60 Run Voltage (kVolts): 13.0 PreRun Voltage (kVolts): 15 Injection Voltage (kVolts): 1.2

Run Time (sec.): 1500 PreRun Time (sec.): 180 Injection Time (sec.): 10 Data Delay (sec.): 1

▼ Advanced Options

Following values are not recommended to be changed.

Voltage Tolerance (kVolts): 0.7 Voltage # of Steps (nk): 20 Voltage Step Interval (sec.): 15

First Read Out Time (ms): 160 Second Read Out Time (ms): 160

Normalization Target: 3800.0 Normalization Factor Threshold Min: 0.3 Normalization Factor Threshold Max: 3.0

Close Save



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	1600

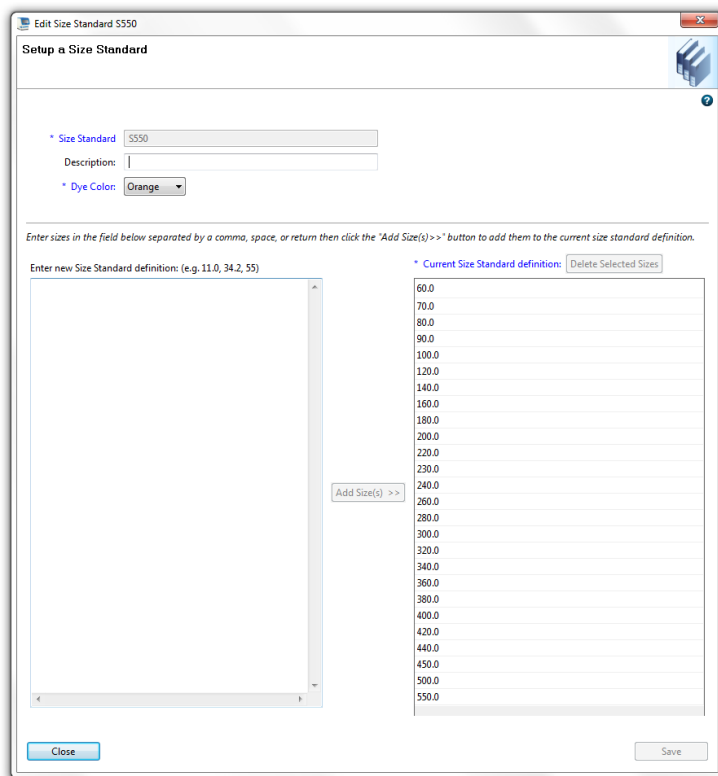
Нажать кнопку **Save**.

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.

#### 4.3 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**.



#### 4.4 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**:

Edit QC Protocol GORDIZ

**Setup a QC Protocol**

\* Protocol Name: GORDIZ

Description:

Size Standard: S550

Sizecaller: SizeCaller v1.1.0

Analysis Settings: QC Settings

Analysis Range: Full Sizing Range: Full Size Calling Method: Local Southern

Analysis Start Point: 0 Sizing Start Size: 0

Analysis Stop Point: 1000000 Sizing Stop Size: 100000

Peak Amplitude Threshold	Blue	Green	Yellow	Red	Purple	Orange
	175	175	175	175	175	175

Common Settings

Use Smoothing: Light

Use Baselining (Baseline Window (Pts)): 51

Minimum Peak Half Width: 2

Peak Window Size: 15

Polynomial Degree: 3

Slope Threshold Peak Start: 0.0

Slope Threshold Peak End: 0.0

Close Save

Edit QC Protocol GORDIZ

**Setup a QC Protocol**

\* Protocol Name: GORDIZ

Description:

Size Standard: S550

Sizecaller: SizeCaller v1.1.0

Analysis Settings: QC Settings

Size Quality

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

Close Save

Нажать кнопку **Save**.

## 4.5 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>	EXPERT 26
<b>Application Type</b>	HID
<b>Instrument Protocol</b>	EXPERT 26

Create New Assay

Setup an Assay

Assay Setup Help ?

\* Assay Name: EXPERT26 Color: Green

Application Type: HID ☐ Disable Filters

Protocols

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

\* Instrument Protocol: EXPERT26 Edit Create New

\* QC Protocol: GORDIZ Edit Create New

Close Save

Нажать кнопку **Save**.

## 4.6 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Для загрузки образцов в прибор необходимо приготовить смесь Hi-Di™ формамид 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.

В состав набора входит аллельная лестница, рассчитанная на проведение 50 инъекций (при нанесении 1 мкл аллельной лестницы в лунку планшета). При недостаточной чувствительности генетического анализатора допускается увеличение объема вносимой в лунку аллельной лестницы **до 2 мкл**.

Размерный стандарт S550 рассчитан на 240 инъекций. При необходимости, объем вносимого в лунку размерного стандарта S550 может быть снижен до **0.3 мкл** для увеличения возможного количества инъекций. Благодаря высокой плотности фрагментов стандарта S550 обеспечивается высокая точность и воспроизводимость определения длины амплифицированных фрагментов исследуемого образца без потери качества анализа.

При проведении реакции амплификации в объеме 10 мкл (при исследовании образцов сравнения) один набор реагентов CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26» позволяет провести исследование 500 образцов.

## **4.7      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 **ОК**. 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>	EXPERT 26
<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. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ «НАНОФОР 05»

При работе с генетическим анализатором Нанофор 05 и последующем анализе флуоресцентных профилей в программе GeneMarker HID, необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

Для корректной визуализации флуоресцентных меток CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26» необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “CS6”, который должен быть создан пользователем в соответствии с пунктом 5.1 и откалиброван с использованием матрикс-стандарта CS6.

### 5.1 Спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации CO<sub>r</sub>DIS «ЭКСПЕРТ 26» на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 6-ти цветным матрикс-стандартом CS6 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру CS6). Матрикс-стандарт содержит смесь 6-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 CS6 добавить 50 мкл деионизированной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS6 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.

**Перед проведением спектральной калибровки:**

1. Приготовьте 50 мл свежего ТАПС буфера однократного разведения. Для этого смешайте 45 мл деионизованной воды и 5 мл 10-кратного ТАПС буфера. Смесь перемешивать переворачиванием не менее 30 раз.
2. Промойте деионизованной водой контейнеры для воды, слива и катодного буфера.
3. Смените септы контейнеров для воды, слива и катодного буфера.
4. При замене катодного буфера также всегда заменяйте анодный буфер (также при замене анодного буфера всегда заменяйте катодный буфер). Катодный и анодный буферы должны быть разлиты из одного и того же разведения 1х ТАПС буфера.
5. Залейте свежий буфер в контейнеры для катодного и анодного буфера, деионизованную воду – в контейнеры для воды и для слива.

**Подготовка матрикс-стандарта для калибровки**

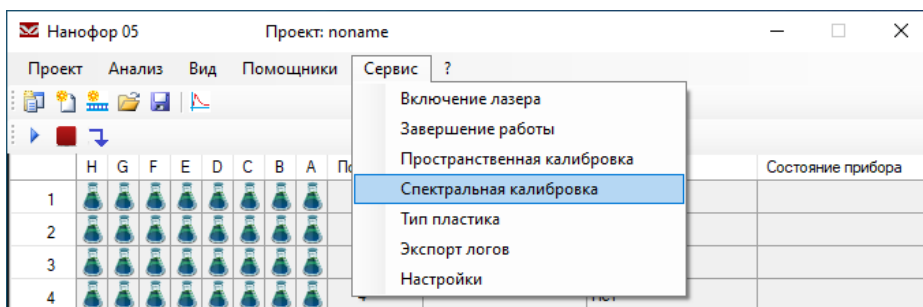
Ni-Di формамид	80 мкл
Раствор CS6	8 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки А-Н 96-луночного планшета.

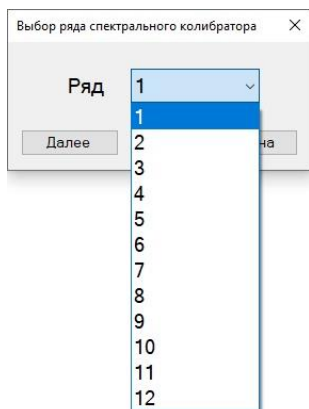
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

**Спектральная калибровка**

В главном окне программы НАНОФОР 05 в пункте меню **Сервис** выбрать опцию **Спектральная калибровка**.

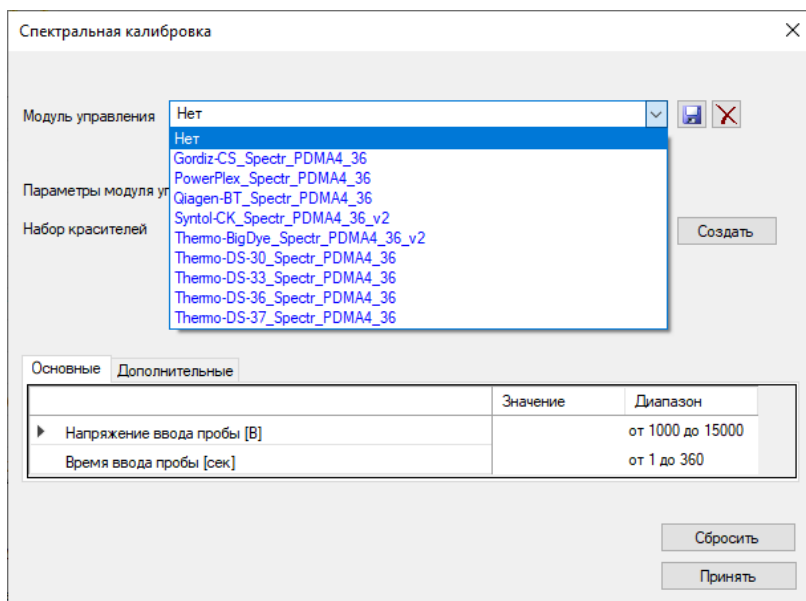


Появится окно **Выбор ряда спектрального калибратора**.



При нажатии кнопки **Далее** появляется окно **Спектральная калибровка**. В выпадающем списке нужно выбрать **Модуль управления**:

### Gordiz-CS\_Spectr\_PDMA4\_36





При необходимости в **Модуле управления** можно изменить параметры выбранной программы и сохранить его, либо оставить программу без изменений.

Из выпадающего списка **Набор красителей** выберите **Gordiz-CS6**.



Спектральная калибровка

Модуль управления: Gordiz-CS\_Spectr\_PDMA4\_36  

Для набора красок Gordiz-CS5/CS6. Длительность – 27 мин.

Параметры модуля управления:

Набор красителей: Не выбран Просмотр Создать

**Основные** **Дополн**

- GenSeq MS
- Gordiz-CS5
- Gordiz-CS6
- PowerPlex-5C
- PowerPlex-6C
- Qiagen-BT5
- Qiagen-BT6
- Qiagen-BT6\_v2
- Syn5Dye
- Syntol-CK-5
- Syntol-CK-6
- Thermo-BigDye\_v1.1
- Thermo-BigDye\_v3.1
- Thermo-D5-30
- Thermo-D5-33
- Thermo-D5-36
- Thermo-D5-37
- Не выбран

Диапазон

от 1000 до 15000



от 1 до 360

Сбросить

Принять

Появится окно Спектральная калибровка. Нажмите **Принять**.

Спектральная калибровка

Модуль управления: Gordiz-CS\_Spectr\_PDMA4\_36  

Для набора красок Gordiz-CS5/CS6. Длительность – 27 мин.

Параметры модуля управления:

Набор красителей: Gordiz-CS6 Просмотр Создать

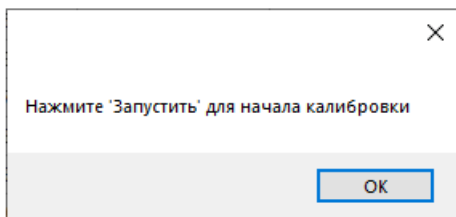
**Основные** **Дополнительные**


	Значение	Диапазон
Напряжение ввода пробы [В]	3000	от 1000 до 15000
Время ввода пробы [сек]	20	от 1 до 360

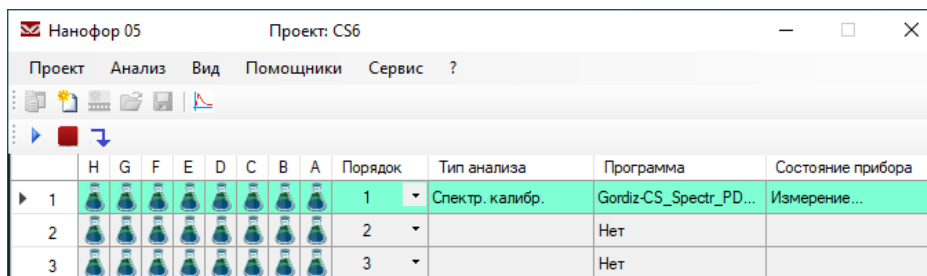
Сбросить

Принять

Нажмите **ОК**, чтобы перейти к запуску Спектральной калибровки:



Для запуска спектральной калибровки в меню главного окна программы НАНОФОР 05 нажать кнопку  **Запустить** или в пункте меню **Действия** выбрать опцию **Запустить**.



После завершения программы измерений данные анализируются автоматически. В результате открывается окно **Набор красителей** с рассчитанными оценками качества спектральной калибровки по каждому капилляру. Возможны три варианта оценки качества: **Хорошее**, **Удовлетворительное** и **Плохое**. В последнем случае калибровку рекомендуется переставить.

Если качество спектральной калибровки для всех капилляров **Хорошее** (допускается для одного капилляра – **Удовлетворительно**), нажать кнопку **Принять**. Калибровка сохранится под заданным в строке **Набор** названием и со временем ее проведения в формате год.месяц.число час.минута начала калибровки.

Набор красителей

Набор

Gordiz-CS6

Редакт

число красителей: 6

Калибровка

2020.06.07 13.55

☐ показывать все

Качество

Графики

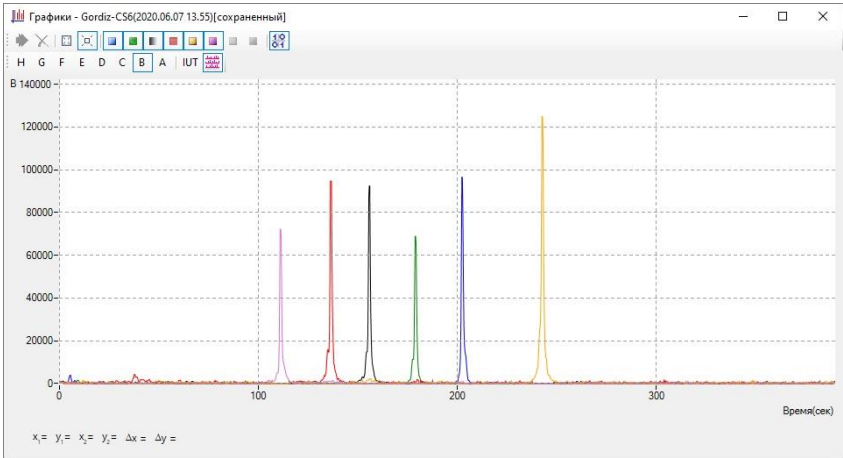
Пересчет по пор.

	Краситель	Цвет	Длина волны	Порядковый номер пика
►	Blue	Синий	0	5
	Green	Зеленый	0	4
	Yellow	Черный	0	3
	Red	Красный	0	2
	Purple	Желтый	0	6
	Orange (с.д.)	Пурпурный	0	1

	СКО	Ошибки	Качество
► Капилляр H	0.04		Хорошее
Капилляр G	0.02		Хорошее
Капилляр F	0.02		Хорошее
Капилляр E	0.02		Хорошее
Капилляр D	0.03		Хорошее
Капилляр C	0.06		Хорошее
Капилляр B	0.03		Хорошее
Капилляр A	0.04		Хорошее

Закреть

Типичный вид данных после применения матриц:



## 5.2 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 от производителя оборудования.

В состав набора входит аллельная лестница, рассчитанная на проведение 50 инъекций (при нанесении 1 мкл аллельной лестницы в лунку планшета). При недостаточной чувствительности генетического анализатора допускается увеличение объема вносимой в лунку аллельной лестницы **до 2 мкл**.

Размерный стандарт S550 рассчитан на 240 инъекций. При необходимости, объем вносимого в лунку размерного стандарта S550 может быть снижен до **0.6 мкл** для увеличения возможного количества инъекций. Благодаря высокой плотности фрагментов стандарта S550 обеспечивается высокая точность и воспроизводимость определения длины амплифицированных фрагментов исследуемого образца без потери качества анализа.

Дополнительный размерный стандарт S550 может быть заказан по каталожному номеру S550-10.

### 5.3 Создание проекта

Для создания нового проекта в главном окне программы НАНОФОР 05 в пункте меню **Проект** выбрать опцию **Создать**. В открывшемся окне **Свойства проекта** ввести имя оператора, название проекта. Убедиться в соответствии типа **Пластика** – Стрип / Планшет. При необходимости выбрать верный варианты типа пластика. Нажать кнопку **Принять**.

Свойства проекта

Оператор: user

Имя проекта: Project 1

Путь для резервного сохранения: ...

Пластик: Планшет, тип SSI-3425 или SSI-3400

Полимер: ПДМА-4 (C010822)  
Дата установки полимера: 09.11.2022  
Линейка капилляров : 1221297s (36)  
Дата установки капилляров : 09.11.2022  
Количество анализов : 2

Принять Отмена

Откроется главное окно **Описание проекта**.

Описание проекта: Project 1

Панель | Таблица

Тип образца  
Образец  
Применить

Стандарт длин  
Нет  
Применить

Имя файла  
<Name>  
Изменить

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
ПА												

ПА - Программа Анализа

Принять Отмена

Внести информацию об образцах: заполнить названия образцов и задать **Программу Анализа (ПА)**.

На поле ПА нужного ряда нажать на левую кнопку мыши два раза.  
Откроется окно **Программа анализа**.

В графе **Тип анализа** выбрать: **Фрагментный**

В графе **Модуль управления** открыть выпадающий список. Выбрать **HID\_600\_PDMA4\_36**

В графе **Набор красителей** выбрать **Gordiz-CS6**.

Программа анализа

Тип анализа

Фрагментный

Модуль управления

HID\_600\_PDMA4\_36

Длина фрагментов до 600 нуклеотидов. Длительность - 36 мин.

Параметры модуля управления:

Набор красителей

Gordiz-CS6

Подробнее

Калибровка от

2022.11.09 18.42

Основные

Дополнительные

	Значение	Диапазон
▶ Напряжение ввода пробы [В]	1200	от 1000 до 15000
Время ввода пробы [сек]	15	от 1 до 360

Сбросить

Принять

Нажать кнопку **Принять**. Откроется окно **Описание проекта**, вкладка **Планшет**, с заданной **Программой анализа**.

Описание проекта:

Планшет Таблица

Тип образца  
Образец  
Применить

Стандарт длин  
Нет  
Применить

Имя файла  
<Name>  
Изменить

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 Образец Нет разм...											
B	2 Образец Нет разм...											
C	3 Образец Нет разм...											
D	4 Образец Нет разм...											
E	5 Образец Нет разм...											
F	6 Образец Нет разм...											
G	7 Образец Нет разм...											
H	8 Образец Нет разм...											
▶ ПА	HID_600 Gordiz-CS6 2022.11.09	HID_600_PDMA4_36 Gordiz-CS6#2022.11.09 18.42										

ПА – Программа Анализа

Принять Отмена

Нажать кнопку **Принять**. Откроется главное окно программы НАНОФОР 05 и в графе **Статус** в выбранном ряду проекта появится надпись **Готов к анализу**.

Нанопор 05 Проект: Project 1

Проект Анализ Вид Помощники Сервис ?

	H	G	F	E	D	C	B	A	Порядок	Тип анализа	Программа	Состояние прибора
▶ 1									1	Фрагментный	HID_600_PDMA4_36	Готов к анализу
2									2		Нет	
3									3		Нет	
4									4		Нет	
5									5		Нет	
6									6		Нет	
7									7		Нет	
8									8		Нет	
9									9		Нет	
10									10		Нет	
11									11		Нет	
12									12		Нет	

Текущая


Все

всего 0 ч 36 мин

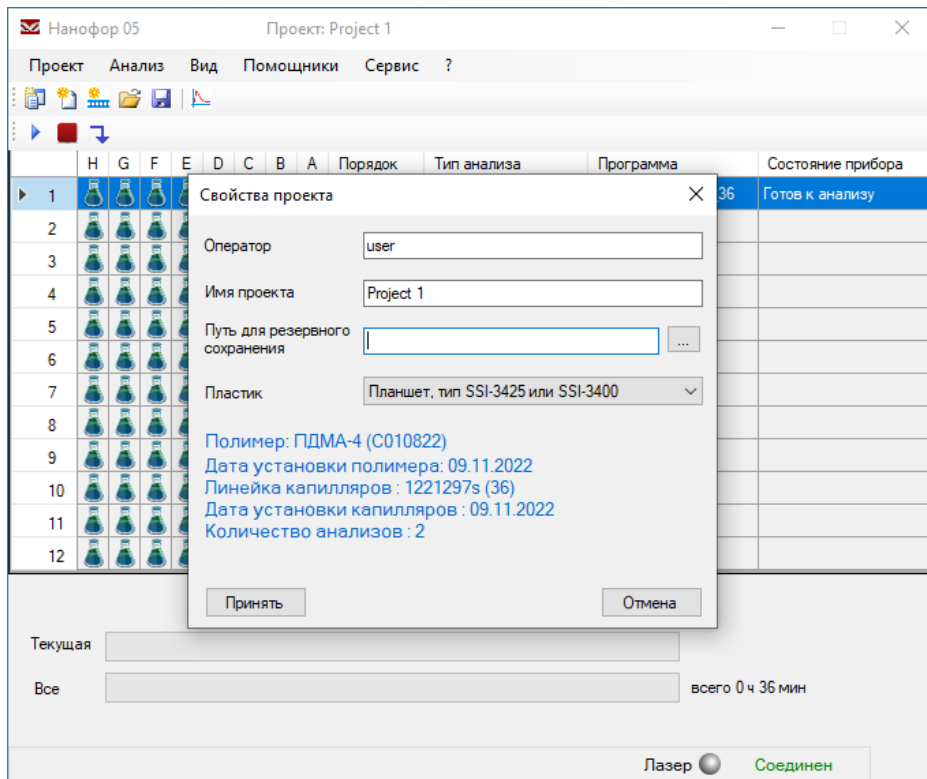
Лазер Соединен



## 5.4 Запуск анализа проекта

Для запуска анализа, после описания всех загруженных образцами рядов проекта, в меню главного окна программы НАНОФОР 05 нажать кнопку  **Запустить** или в пункте меню Действия выбрать опцию **Запустить**.

Появится окно **Свойства проекта**.



В открывшемся окне **Свойства проекта** ввести/изменить имя оператора, название проекта, при необходимости – указать путь сохранения дополнительной копии данных (если дополнительная копия данных не нужна – это поле оставляется пустым). Убедиться в соответствии типа **Пластика** – Стрип / Планшет. При необходимости выбрать верный вариант типа пластика.

Нажать **Принять**. Активируется главное окно программы НАНОФОР 05. Первый анализируемый ряд проекта выделится зеленым цветом, а в графе статус появится надпись **Измерение**.

В нижней части окна рядом с надписью **Лазер** серый индикатор должен стать красным — это означает, что лазер включен.

В конце строки **Текущая** отобразится время до конца текущего анализа, а в конце строки **Все** — время до конца анализа всех рядов проекта.

В зависимости от состояния используемого прибора параметр **Время ввода пробы** может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала (5–15 sec.). Параметр **Время электрофореза** 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 Настройка программного обеспечения GeneMapper

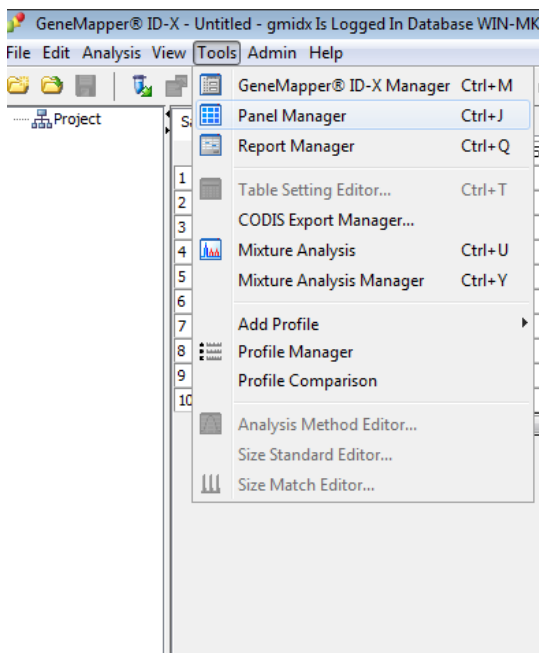
Полученные данные могут быть проанализированы с использованием программного обеспечения GeneMapper ID и GeneMapper ID-X.

Программное обеспечение GeneMapper требует предварительной настройки параметров анализа. Параметры анализа для наборов CO<sub>2</sub>DIS могут быть импортированы в программу из файлов настроек, предоставляемых производителем по запросу.

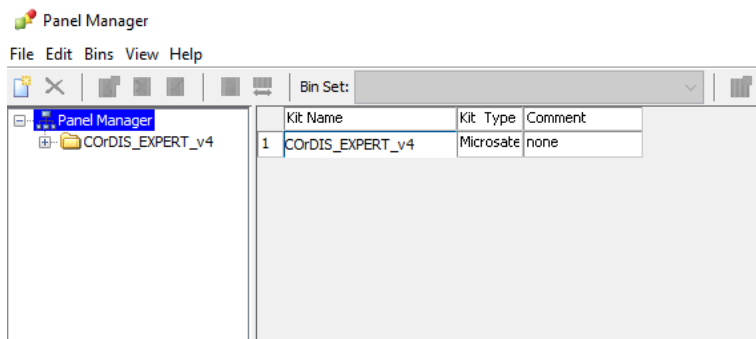
Для анализа результатов электрофореза с использованием программного обеспечения GeneMapper необходимо произвести следующие действия:

#### 1) Произвести импорт файлов панелей и бинов

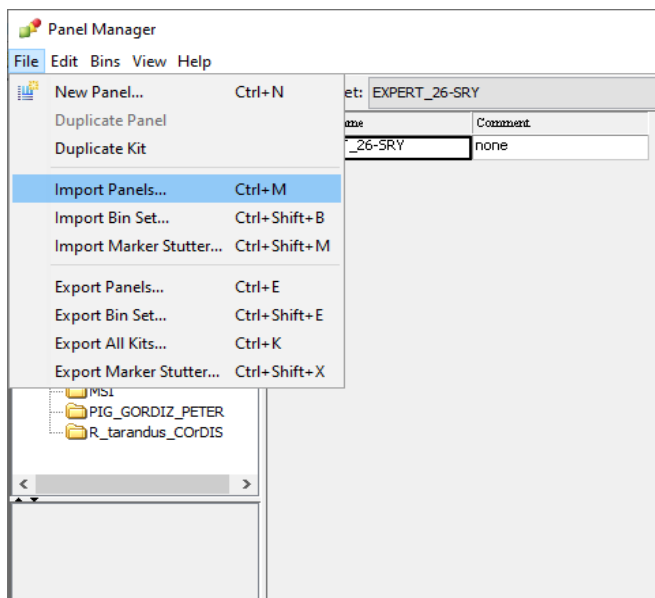
Выбрать пункт меню Tools->Panel Manager.



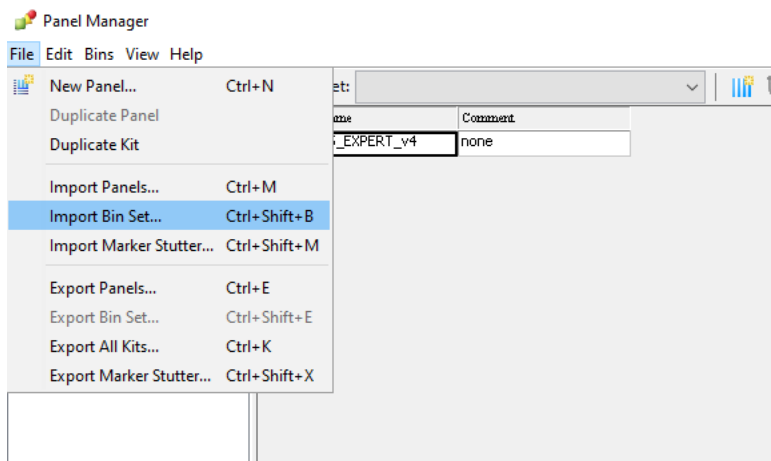
В левом верхнем сегменте открывшегося окна установить курсор на позицию Panel Manager.



Затем в меню выбрать File->Import panels.



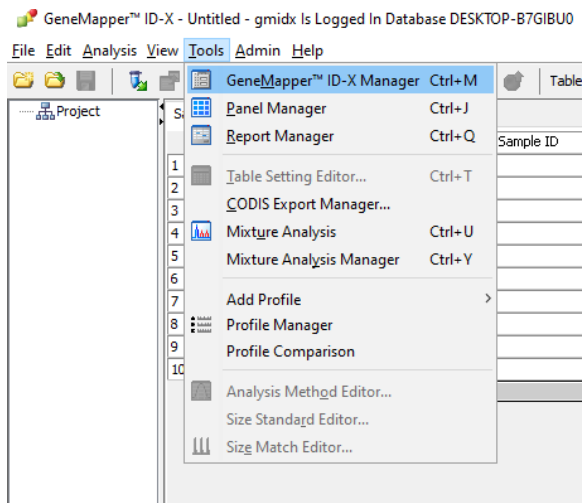
В открывшемся окне найти и выбрать файл с панелями (например, файл EXPERT 26-SRY). Загрузить нажатием кнопки Import.



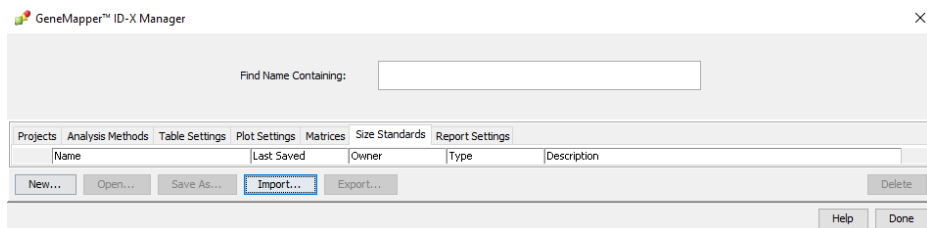
В левом верхнем сегменте окна выбрать загруженную панель (Например, EXPERT 26), затем в меню выбрать File->Import bin set. В открывшемся окне найти и выбрать файл с бинами (Например, файл EXPERT 26\_bins). Загрузить нажатием кнопки Import. Нажать кнопки Apply и OK.

## 2) Произвести импорт настроек размерного стандарта

Выбрать пункт меню Tools > GeneMapper Manager.



В открывшемся окне выбрать вкладку Size Standards.



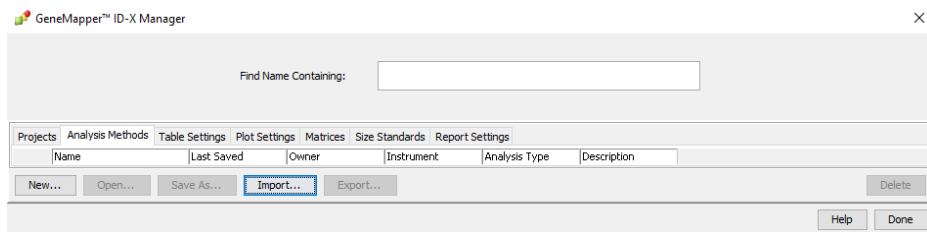
Загрузить файл настроек размерного стандарта нажатием кнопки Import. Нажать кнопку **Done**.

## 3) Создать новый метод анализа

Выбрать пункт меню Tools -> GeneMapper Manager.

открывшемся окне выбрать вкладку Analysis Methods.

Нажать кнопку **Import** и загрузить файл настроек Метода Анализа. Нажать кнопку Done. 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.

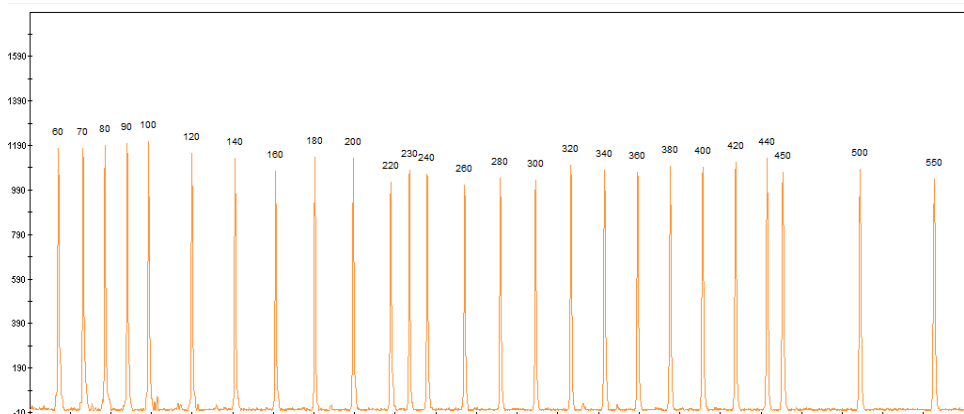


Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550. Размеры фрагментов.

### 6.3 Диапазоны размеров аллелей исследуемых локусов

Локус	Аллели МК01	Канал детекции	Диапазон длин фрагментов	Диапазон аллелей
Amelogenin X	X	синий	81	X
Amelogenin Y	Y	синий	84	Y
SRY	SRY	синий	89	SRY
D3S1358	15,17	синий	93-148	11- 20
TH01	6,9,3	синий	152-197	4-13.3
D12S391	21,23	синий	203-267	15-26
D5S818	9,12	синий	269-325	6-15
TPOX	8,9	синий	327-379	6-13
Yindel	2	зеленый	78-87	1-2
D2S441	14	зеленый	93-133	8-16
D7S820	10,12	зеленый	137-185	5-14
D13S317	11	зеленый	186-240	7-16
FGA	20,22.2	зеленый	240-399	16-45.2
D22S1045	15	желтый	82-127	10-19
D18S51	14,16	желтый	127-213	7-27
D16S539	12,13	желтый	213.4-260	8-15
D8S1179	10	желтый	260-318	8-17
CSF1PO	9,11	желтый	320-370	8-15
D6S1043	11	желтый	375-454	10-21.3
vWA	16,18	красный	85-157	8-22
D21S11	30.2	красный	158-227	23.2-37
SE33	24.2,29.2	красный	227-385	4.2-43
D10S1248	15	фиолетовый	90-145	10-17
D1S1656	14,17.3	фиолетовый	170-227	10-20.3
D19S433	13,15	фиолетовый	228-286	11-16.2
D2S1338	17,21	фиолетовый	289-367	15-27
DYS391	10	фиолетовый	380-435	5-16

## 6.4 Амплификация контрольной ДНК

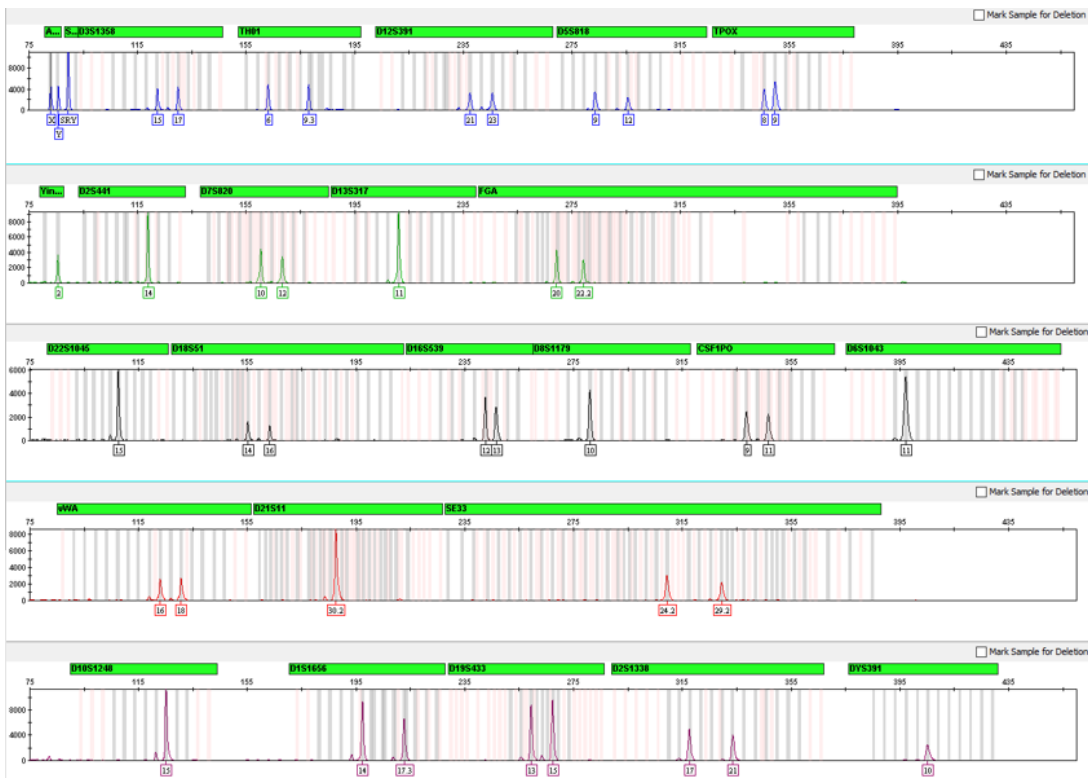


Рисунок 2 Результаты анализа Контрольной ДНК МК01.



## 6.5 Аллельная лестница

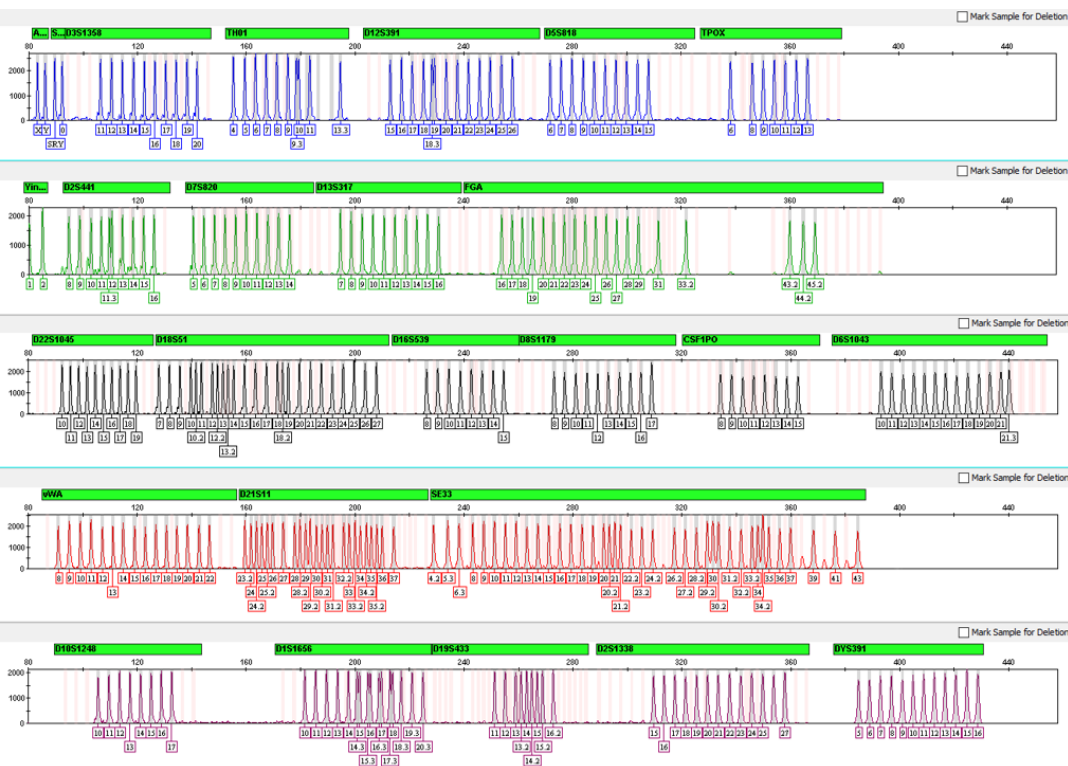


Рисунок 3. Аллельная лестница CoDIS «ЭКСПЕРТ 26».

## 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](http://www.gordiz.ru)

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