

# CO<sup>r</sup>DIS Cattle Plus

## Набор реагентов для мультиплексного анализа 18-ти микросателлитных маркеров крупного рогатого скота

### Инструкция пользователя

#### Оглавление

<b>1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ</b>	<b>3</b>
1.1 Описание продукта	3
1.2 Компоненты набора и состав	5
1.3 Условия хранения и транспортировки	6
1.4 Основные характеристики набора	7
1.5 Гарантии качества	7
1.6 Сопутствующие материалы	7
<b>2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ</b>	<b>7</b>
2.1 Контрольная ДНК	7
2.2 Размерный стандарт S550	8
<b>3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ</b>	<b>8</b>
3.1 Стандартный протокол амплификации	8
3.2 Протокол амплификации с использованием реагентов для быстрого лизиса CO <sup>r</sup> DIS Sprint	9
3.3 Протокол амплификации с использованием материала на бумажных носителях	10
3.4 Условия амплификации	10
<b>4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI 3130/3130XL</b>	<b>11</b>
4.1 Спектральная калибровка	11
4.2 Условия капиллярного электрофореза	14
4.3 Создание Instrument Protocol	14
4.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	15
4.5 Запуск прибора	16
4.6 Оптимизация интенсивности сигналов	17
<b>5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI 3500/3500XL</b>	<b>17</b>

---

5.1	Спектральная калибровка	17
5.2	Создание Instrument Protocol	19
5.3	Создание Assay	20
5.4	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	20
5.5	Запуск прибора	21
5.6	Оптимизация интенсивности сигналов	22
<b>6.</b>	<b>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ LOCUS SEQTOR 1616</b>	<b>22</b>
6.1	Спектральная калибровка	22
6.2	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	26
6.3	Запуск прибора	26
6.4	Оптимизация интенсивности сигналов	28
<b>7.</b>	<b>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ «НАНОФОР 05»</b>	<b>28</b>
7.1	Спектральная калибровка	28
7.2	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	34
7.3	Создание проекта	34
7.4	Запуск анализа проекта	37
<b>8.</b>	<b>АНАЛИЗ ДАННЫХ</b>	<b>39</b>
8.1	Анализ результатов в программе MacSTRo	39
8.2	Анализ результатов в программе GeneMapper	44
8.3	Размерный стандарт S550	48
8.4	Диапазоны размеров микросателлитных маркеров	49
8.5	Амплификация контрольной ДНК	50
<b>9.</b>	<b>ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	<b>51</b>
<b>10.</b>	<b>ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ</b>	<b>52</b>
<b>11.</b>	<b>ВЕРСИЯ ДОКУМЕНТА</b>	<b>52</b>

## 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

### 1.1 Описание продукта

COrDIS Cattle Plus – является расширением набора COrDIS Cattle (набор для молекулярно-генетической характеристики крупного рогатого скота с целью анализа родства и ДНК-индивидуализации животных на основе мультиплексного ПЦР-анализа 15-ти локусов). Для подтверждения происхождения поголовья крупного рогатого скота с низким генетическим разнообразием расширили панель маркеров до 18 микросателлитных локусов, что позволяет идентифицировать животных, близких по происхождению.

Из 18-ти анализируемых STR-локусов 12 составляют стандартную панель маркеров, рекомендованную Международным Обществом Генетики Животных (International Society of Animal Genetics - ISAG): ETH3, INRA023, TGLA227, TGLA126, TGLA122, SPS115, ETH225, TGLA53, BM2113, BM1824, ETH10, BM1818. Кроме того, в набор входят шесть дополнительных высокополиморфных микросателлитных локусов, рекомендованных Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO): CSSM66, ILSTS006, CSRM60, SPS113, RM067 и MGTG4B. Все эти локусы представляют собой tandemные динуклеотидные повторы.

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 18-ти локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов <320 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с лазериндуцированной флуоресцентной детекцией. В наборе COrDIS Cattle Plus 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*. Размерный стандарт S550 мечен пятым, флуоресцентным красителем и детектируется в отдельном канале *Orange* одновременно с продуктами ПЦР. Для получения полного STR-профиля образца достаточно 0,4 нанограмма недеградированной ДНК. Допускается внесение до 100 нг ДНК в ПЦР. Оптимальный объем ДНК устанавливается лабораторией индивидуально в зависимости от методики выделения ДНК и типа генетического анализатора. Реакционная смесь в наборе аликвотирована в реакционных

стрипованных пробирках 0,2 мл и поставляется в лиофилизированном виде, благодаря чему реакционные смеси могут храниться при комнатной температуре не менее 18 месяцев без потери чувствительности. Компоненты реакции активируются добавлением определенного объема раствора активатора в каждую пробирку. Общий объем реакции 25 мкл. Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 20 мкл. Благодаря высокой устойчивости реакционной смеси к действию ингибиторов, большой объем препарата ДНК не препятствует успешной амплификации.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах производства Applied Biosystems: GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, ProFlex PCR System, SimpliAmp™ Thermal Cycler, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, MiniAmp Thermal Cycler и BioRad T100 Thermal Cycler. Допускается использование других моделей термоциклеров соответствующих указанным техническим характеристикам:

Минимальный объем	не более 10 мкл
Возможность регулирования скорости изменения температуры образца	не более 3°C/сек

Если параметры амплификаторов не соответствуют указанным техническим характеристикам, рекомендуется проведение валидации оборудования.

Анализ ПЦР-продуктов может проводиться с использованием генетических анализаторов ABI 3130/3130XL/3500/3500XL (Applied Biosystems), Нанофор 05 (СИНТОЛ), HONOR 1616, LOCUS Sectors 1616.

Анализ данных может проводиться с использованием ПО Maestro (ООО ГОРДИЗ), GeneMapper (Thermo Fisher Scientific), GeneMarker (SoftGenetics), Genmap (Helicon).

**Таблица 1. Описание микросателлитных маркеров COrDIS Cattle Plus**

Лocus	Хромосома	Тип повтора	Структура единицы повтора
ETH3	19	сложный	$(GT)_nAC(GT)_6$
CSSM66	14	простой	$(AC)_n$
INRA023	3	простой	$(AC)_n$
BM1818	23	простой	$(TG)_n$
TGLA227	18	простой	$(TG)_n$
TGLA126	20	простой	$(TG)_n$
TGLA122	21	сложный	$(AC)_n(AT)_n$
SPS115	15	сложный	$(CA)_nTA(CA)_6$
ILSTS006	7	простой	$(GT)_n$
SPS113	10	простой	$(CA)_n$
ETH225	9	сложный	$(TG)_4CG(TG)(CA)_n$
TGLA53	16	сложный	$(TG)_6CG(TG)_4(TA)_n$
RM067	4	простой	$(CA)_n$
CSRM60	10	простой	$(AC)_n$
BM2113	2	простой	$(CA)_n$
BM1824	1	простой	$(GT)_n$
ETH10	5	простой	$(AC)_n$
MGTG4B	4	простой	$(CA)_n$

## 1.2 Компоненты набора и состав

### COrDIS Cattle Plus

- |                                      |                                    |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| 1. Стрипы с сухой реакционной смесью | 96 пробирок, 12 стрипов 8 x 0.2 мл |
| 2. Раствор Активатора VN             | 1 пробирка, 500 мкл                |
| 3. Деионизованная вода               | 2 пробирки, 1.7 мл                 |
| 4. Контрольная ДНК КРС-K5            | 1 пробирка (40 реакций)            |
| 5. Размерный стандарт S550           | 1 пробирка (120 нанесений)         |

**Стрипы с реакционными смесями** представляют собой реакционные пробирки объемом 0.2 мл, объединенные в стрипы по 8 шт. и предназначены для проведения в них полимеразной цепной реакции.

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

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

**Контрольная ДНК КРС-К5** представляет собой высокомолекулярную лиофилизированную геномную ДНК коровы с известным генотипом по всем исследуемым локусам (Рис. 2, стр. 46). Предназначена для контроля этапов амплификации, электрофореза и анализа данных. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует разведения водой (п. 2.1).

**Размерный стандарт S550** представляет собой лиофилизированную смесь флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК разной длины, меченых спектральным аналогом LIZ, детектируемым в канале *Orange*. Размерный стандарт S550 содержит 26 фрагментов ДНК разной длины: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450, 500 и 550. Стандарт S550 используется на этапе капиллярного электрофореза, вносится в каждый капилляр одновременно с исследуемым образцом и служит опорным внутренним стандартом для построения кривой подвижности амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Благодаря высокой плотности фрагментов стандарта S550 обеспечивается высокая точность и воспроизводимость определения длины амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Перед использованием требует разведения водой (п. 2.2).

### 1.3 Условия хранения и транспортировки

Все компоненты за исключением раствора Активатора VN и деионизованной воды, поставляются в сухом виде. В связи с этим при транспортировке не требуется соблюдение специального температурного режима.

Стрипы с реакционными смесями и размерный стандарт S550 чувствительны к воздействию света и должны храниться в темном месте.

Стрипы с реакционными смесями и раствор активатора рекомендовано хранить при температуре от  $+2^{\circ}C$  до  $+8^{\circ}C$ .

Контрольная ДНК и размерный стандарт S550 после разведения лиофилизированных компонентов водой, могут храниться при  $+2^{\circ}C$  до  $+8^{\circ}C$  в течение месяца.

Длительное хранение компонентов набора рекомендовано при температуре от  $-15^{\circ}C$  до  $-25^{\circ}C$ .

## 1.4 Основные характеристики набора

Количество одновременно анализируемых маркеров – 18;

Список одновременно анализируемых локусов: ETH3, INRA023, TGLA227, BM1818, TGLA126, TGLA122, SPS115, ETH225, TGLA53, BM2113, BM1824, ETH10, CSSM66, ILSTS006, BM1818, CSRM60; SPS113, RM067 и MGTG4B.

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 5;

Оптимальное количество вносимой ДНК: 2 нг;

Диапазон концентраций ДНК для проведения амплификации от 0,4 нг до 100 нг в реакцию.

## 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 Cattle Plus, просим незамедлительно связаться с ООО “ГОРДИЗ”.

## 1.6 Сопутствующие материалы

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

Реагент	Производитель	Каталожный номер
Спектральный калибратор CS5	ООО “ГОРДИЗ”	CS5
Бины и панели	ООО “ГОРДИЗ”	по запросу

## 2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ

### 2.1 Контрольная ДНК

Добавить 40 мкл деионизованной воды, поставляемой с набором, в пробирку с сухой контрольной ДНК (пробирка с зеленой крышкой). Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Для проведения ПЦР необходимо добавить 1 мкл контрольной ДНК в реакционную пробирку. После разведения, контрольная ДНК может храниться при температуре от +2°C до +8°C в течение месяца. Длительное хранение рекомендовано при температуре от -15°C до -25°C. Следует избегать многократного размораживания.

## 2.2 Размерный стандарт S550

Перед использованием добавить 120 мкл деионизованной воды в пробирку с сухим размерным стандартом S550 (пробирка с желтой крышкой). Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием.

После разведения размерный стандарт S550 может храниться при температуре от +2°C до +8°C в течение месяца. Длительное хранение рекомендовано при температуре от -15°C до -25°C. Следует избегать многократного размораживания.

Для проведения капиллярного электрофореза добавить 1 мкл стандарта S550 в каждую лунку планшета, содержащую формамид и ПЦР продукт.

## 3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

### 3.1 Стандартный протокол амплификации

В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Раствора Активатора VN. Затем внести деионизованную воду и раствор исследуемой геномной ДНК. Оптимальный объем ДНК и воды устанавливается лабораторией индивидуально в зависимости от методики выделения ДНК и ее концентрации. Рекомендуется вносить 1-5 мкл ДНК и 15-19 мкл воды соответственно, чтобы общий объем реакции составил 25 мкл. Деионизованная вода поставляется в наборе.

<u>Компоненты набора</u>	<u>Объем на 1 реакцию</u>
Раствор активатора	5 мкл
Геномная ДНК*	1-5 мкл
<u>Деионизованная вода, до конечного объема 25 мкл</u>	<u>15-19 мкл</u>

\*рекомендуемая концентрация указана в пункте 1.4

При работе со следовыми количествами ДНК допускается полное замещение воды геномной ДНК при использовании методик, позволяющих получать высокоочищенную ДНК.

Необходимо учитывать, что в некоторых случаях при добавлении ДНК в объеме более 5 мкл возможно внесение избытка ингибирующих веществ в реакцию, что может приводить к снижению чувствительности. Тем не менее, набор COrDIS Cattle Plus 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 деионизованной воде происходит постоянный гидролиз ДНК. Для длительного хранения рекомендуется разведение ДНК в буферах (pH>7), содержащих небольшое количество ЭДТА (например, TE с  $\leq 0,1$  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** (1 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором + 19 мкл деионизованной воды + 5 мкл Раствора активатора) и один **отрицательный контроль** (20 мкл деионизованной воды + 5 мкл Раствора активатора).

### 3.2 Протокол амплификации с использованием реагентов для быстрого лизиса COrDIS Sprint

При использовании реагентов для быстрого лизиса клеток COrDIS Sprint добавьте в чистую пробирку или стрип 100 мкл COrDIS Sprint и от 2 до 5 мкл крови. Оптимальный объем крови устанавливается лабораторией индивидуально в зависимости от качества материала. При внесении более 5 мкл крови возможно ингибирование ПЦР. Инкубируйте 20 минут при температуре 80° согласно инструкции COrDIS Sprint. Полученный лизат используйте для постановки реакции ПЦР.

В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Раствора Активатора, 18 мкл деионизованной воды и 2 мкл лизата. Деионизованная вода поставляется в наборе.

<u>Компоненты набора</u>	<u>Объем на 1 реакцию</u>
Раствор активатора	5 мкл
Лизат	2 мкл
Деионизованная вода, до конечного объема 25 мкл	18 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** (1 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором + 19 мкл деионизованной воды + 5 мкл Раствора активатора) и один **отрицательный контроль** (20 мкл деионизованной воды + 5 мкл Раствора активатора).

### 3.3 Протокол амплификации с использованием материала на бумажных носителях

Набор реагентов COrDIS Cattle Plus позволяет проводить амплификацию материала с бумажных носителей. При исследовании биоматериала на бумажных носителях в каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Раствора активатора, 20 мкл Деионизованной воды, затем внести исследуемый образец. Оптимальный диаметр вносимого предмета-носителя (панч карты) составляет 1.2 мм. Оптимальное количество вносимого материала зависит от структуры материала носителя и особенностей, собираемых на носитель образцов.

<u>Компоненты набора</u>	<u>Объем на 1 реакцию</u>
Раствор активатора	5 мкл
Деионизованная вода	20 мкл
Геномная ДНК	1 панч

После внесения всех компонентов, реакционную смесь необходимо тщательно перемешать до гомогенного состояния 5–8 кратным пипетированием, либо используя вортекс. При необходимости собрать раствор на дне пробирки коротким центрифугированием. Тщательное перемешивание необходимо для максимальной эффективности реакции.

С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один **положительный контроль** (1 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором + 19 мкл деионизованной воды + 5 мкл Раствора активатора) и один **отрицательный контроль** (20 мкл деионизованной воды + 5 мкл Раствора активатора).

### 3.4 Условия амплификации

Приведённые ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных параметров.

## Параметры ПЦР:

---

94°C	3 мин	
98°C	10 сек	
59°C	120 сек	4 цикла
72°C	40 сек	
94°C	10 сек	
59°C	120 сек	6 циклов
72°C	40 сек	
90°C	10 сек	
59°C	120 сек	18 циклов
72°C	40 сек	
68°C	10 мин	
15°C	∞	

## 4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI 3130/3130XL

При работе с генетическим анализатором необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

Для корректной визуализации пяти флуоресцентных меток COrDIS Cattle Plus необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “**any5dyes**” с использованием спектрального калибратора CS5.

### 4.1 Спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Cattle Plus на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным спектральным калибратором CS5 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру CS5). Спектральный калибратор 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 спектрального калибратора CS5 необходимо добавить **50 мкл** деионизованной 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 от -15°C до -25 °C. Следует избегать многократного размораживания.

### **Подготовка спектрального калибратора (ABI 3130 /4 капилляра)**

Hi-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 спектрального калибратора (ABI 3130XL/16 капилляров)**

Hi-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)**:

<b>Параметр</b>	<b>Значение</b>
Name	например, Spectral36_POP4_CS5
Type	SPECTRAL
Dye Set	any5dye
Polymer	POP4
Array Length	36
Chemistry	Matrix Standard
Run Module	Spect36_POP4_1

Выбрать **ОК** и закрыть **Protocol Editor**.

#### **Шаг В – Создание планшета**

Перейти в **Plate Manager** программы **Data Collection Software** выбрать кнопку **New**. Откроется окно **Plate Dialog**.

**Ввести следующие параметры в диалоговом окне New Plate:**

Name	например, Spectral_any5_CS5
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-Well

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

Ввести в позиции A01:

Sample Name	например, CS5
Priority	например, 100
Instrument Protocol	Spectral36_POP4_CS5 (см. выше)

Выделить ячейку A01 целиком. В меню **Edit** выбрать команду **Fill Down Special**. Программа заполнит введенными значениями соответствующее количество ячеек для одной загрузки капилляров. Например, от A01 до A04 (**ABI 3130 / 4 капилляра**) или от A01 до H02 (**ABI 3130XL / 16 капилляров**).

Выбрать **ОК** чтобы закончить создание планшета и выйти из **Plate Editor**.

### Шаг С – Проведение спектральной калибровки

Перейти во вкладку **Run Scheduler – Plate View** и выбрать **Find All**. Выбрать заданное название созданного планшета (например, Spectral\_any5\_CS5). Связать выбранное название с установленным в прибор планшетом. Запустить прибор.

### Шаг D – Оценка результатов спектральной калибровки

После завершения работы прибора проверить статус каждого капилляра (pass или fail). Открыть **Instrument Status**, перейти во вкладку **Event Log**. В окне **Event Messages** отображается статус всех капилляров. Каждый капилляр должен иметь значение Q-value не ниже **0.95**. Высота пиков должна быть не менее 1.000 rfu, но ниже 5.000 rfu (оптимальный диапазон между 2000 и 4000 rfu).

Дополнительно в окне **Spectral Viewer** можно просмотреть флуоресцентный профиль калибровки для каждого капилляра. Калибровка должна быть успешной минимум для 3 из 4 капилляров (или для 12 из 16 капилляров, соответственно). При использовании CS5 в качестве спектрального калибратора, в окне профиля калибровки должна отражаться следующая последовательность пиков: **синий-зеленый-желтый-красный-оранжевый**.

В случае успешной калибровки рекомендуется ее переименовать, присвоив более удобное название. Для этого нажать кнопку **Rename**, ввести новое название калибровки (например **CS5\_дата**) и нажать **OK**. Нужно иметь виду, что для каждого набора виртуальных фильтров (**dye set**) последняя калибровка автоматически становится активной. Если вы планируете использовать результаты предыдущих калибровок, их необходимо активировать до запуска прибора.

## 4.2 Условия капиллярного электрофореза

Перед проведением первого анализа продуктов амплификации COrDIS Cattle Plus на генетическом анализаторе, необходимо создать соответствующий модуль **Run Module**. Для этого перейти в **Module Manager** программы **Data Collection Software** и нажать кнопку **New**. Откроется окно **Run Module Editor**.

Создать модуль со следующими параметрами:

Параметр	Значение
Oven Temperature	60
Poly Fill Volume	4840
Current Stability	5
PreRun Voltage	15
PreRun Time	180
Injection Voltage	3
Injection Time	5
Voltage Number of Steps	40
Voltage Step Interval	15
Data Delay Time	1
Run Voltage	15.0
Run Time	1700

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

\*значение параметра см. в п. 4.2

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

#### 4.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

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

<u>Компонент</u>	<u>Объем на один образец</u>
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1.0 мкл

При расчете объемов компонентов смеси следует учесть, что формамидом должны быть заполнены все лунки, в которых будет происходить инъекция, в том числе и лунки, не содержащие образцы.

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

**Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:**

<u>95°C</u>	<u>2 мин</u>
<u>4°C</u>	<u>1 мин</u>

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

## 4.5 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе проводится в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем. Для получения корректных результатов необходимо создать соответствующую спектральную калибровку (см. раздел 4.1), **Run Module** (см. раздел 4.2), и **Instrument Protocol** (см. раздел 4.3).

### Шаг А Создание планшета

Перед началом анализа необходимо создать **Plate** (планшет), описывающий расположение образцов на планшете и содержащий инструкции для прибора. Перейти в **Plate Manager** программы **Data Collection Software** и нажать кнопку **New**. Появится диалоговое окно **Plate Dialog**. Ввести следующие параметры:

<u>Параметр</u>	<u>Значение</u>
Name	Например COrDIS_Cattle_Plus_[ <i>dama</i> ]
Application	выбрать GeneMapper
Plate Type	96-Well

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

### Шаг В Заполнение таблицы

<u>Параметр</u>	<u>Значение</u>
Sample Name	Название образца
Priority	обычно 100 (очередность анализа по возрастанию)
Sample Type	Sample / Positive Control / Neg. Control
Size Standard	S550
Panel	COrDIS_Cattle_Plus
Analysis Method	Например, COrDIS_Cattle_Plus
User-defined 1-3	
Results Group	Выбрать соответствующий <b>Results Group</b>
Instrument Protocol	Run36_POP4_CS5

Для удобства в первую очередь лучше ввести все названия образцов. Затем, для первого образца задать все необходимые параметры. Выделить курсором мыши все столбцы. В меню **Edit** выбрать пункт **Fill Down**. Программа заполнит значениями все выделенные ячейки. После этих действий редактировать столбец **Sample Type**, выбрав между значениями **Positive Control / Negative Control**.

## **Шаг С Запуск прибора и информация о статусе прибора**

Перейти в раздел **Run Schedule** и нажать на кнопку **Find All**. Найти в списке название созданного планшета, выделить его и связать нажатием мыши с изображением установленного в приборе планшета. Запустить анализ планшета.

Флуоресцентные профили образцов можно наблюдать в реальном времени в разделе **Capillaries Viewer** или **Cap/Array Viewer**. В случае возникновения системных ошибок информация о них появится в разделе **Event Log (Error Status)**.

### **4.6 Оптимизация интенсивности сигналов**

В зависимости от состояния используемого прибора параметр **Injection Time** может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала (5–15 sec.). Параметр **Run Time** также может быть скорректирован пользователем в случае, если рекомендуемое время фореза является избыточным (все фрагменты размерного стандарта детектируются существенно раньше отведенного времени) или недостаточным (не все фрагменты размерного стандарта детектируются за отведенное время). Оптимальное время фореза в наибольшей степени зависит от текущего состояния капилляров и полимера в генетическом анализаторе и может меняться со временем.

## **5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI 3500/3500XL**

При работе с генетическим анализатором необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

Для корректной визуализации пяти флуоресцентных меток COrDIS Cattle Plus необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “G5” с использованием спектрального калибратора CS5.

### **5.1 Спектральная калибровка**

Анализ продуктов амплификации COrDIS Cattle Plus на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным спектральным калибратором CS5 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру: CS5). Спектральный калибратор содержит смесь 5-ти фрагментов разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями. Эти красители использованы в наборе для мечения ПЦП-продуктов и размерного стандарта S550.

Для приготовления рабочего раствора спектрального калибратора CS5 необходимо добавить 50 мкл деионизованной 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 от -15°C до -25°C. Следует избегать многократного размораживания.

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

### **Подготовка спектрального калибратора (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 спектрального калибратора (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:

<b>Dye Set Name</b>	CS5
<b>Chemistry</b>	Matrix standard
<b>Dye Set Template</b>	G5 Template
<b>Arrange Dyes</b>	оставить без изменений
<b>Matrix Condition Number</b>	20.0
<b>Minimal Quality Score</b>	0.8

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

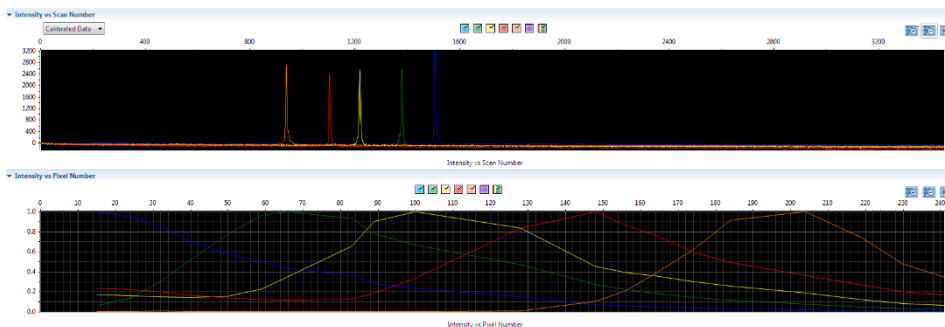
## Шаг В – Проведение спектральной калибровки

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

## Шаг С – Оценка результатов спектральной калибровки

После завершения работы прибора проверить статус каждого капилляра (pass или fail). Высота пиков должна быть не менее 500 rfu, но ниже 10.000 rfu (оптимальный диапазон между 1000 и 5000 rfu).

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



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

## 5.2 Создание Instrument Protocol

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

<b>Application Type</b>	Fragment
<b>Dye Set</b>	CS5
<b>Run Module</b>	например “fragment_36_POP4” (выбрать протокол соответствующий параметрам системы)
<b>Protocol Name</b>	COrDIS_Cattle_Plus

Нажать кнопку **Save**.

### 5.3 Создание Assay

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

В разделе **Manage**, выбрать вкладку **Assays**. В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового Assay). В появившемся окне указать параметры нового Assay:

<b>Assay Name</b>	COrDIS_Cattle_Plus
<b>Application Type</b>	Fragment
<b>Instrument Protocol</b>	COrDIS_Cattle_Plus

Нажать кнопку **Save**.

### 5.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

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

<u>Компонент</u>	<u>Объем на один образец</u>
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1.0 мкл

При расчете объемов компонентов смеси следует учесть, что формамидом должны быть заполнены все лунки, в которых будет происходить инъекция, в том числе и лунки, не содержащие образцы.

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

Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:

95°C	2 мин
4°C	1 мин

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

## 5.5 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI проводится в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем. Для получения корректных результатов необходимо создать соответствующую **спектральную калибровку** (см. раздел 5.1), **Instrument Protocol** (см. раздел 5.2), и **Assay** (см. раздел 5.3).

### Шаг А Создание планшета

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

Name	Например COrDIS [ <i>data</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:

<b>Sample name</b>	имя объекта
<b>Sample type</b>	тип образца (sample)
<b>Assay</b>	COrDIS_Cattle_Plus (add from library – выбрать COrDIS_Cattle_Plus)
<b>Filename convention</b>	структура имени файла (add from library – выберите My_FNC)

**Results group** параметры сохранения файлов (папка, в которую будут сохранены результаты. add from library – выберите My\_Fragment\_Analysis\_Result\_Group)

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

### **Шаг С Запуск прибора и информация о статусе прибора**

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

#### **5.6 Оптимизация интенсивности сигналов**

В зависимости от состояния используемого прибора параметр **Injection Time** может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала (3–15 sec.). 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.

### **6. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ LOCUS SECTOR 1616**

При работе с генетическим анализатором Locus Sector 1616, и последующем анализе флуоресцентных профилей в программе MacSTRo или GeneMapper™, необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования. Для корректной визуализации пяти флуоресцентных меток COrDIS Cattle Plus необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей «E5» с использованием спектрального калибратора CS5.

#### **6.1 Спектральная калибровка**

Анализ продуктов амплификации COrDIS Cattle Plus на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным спектральным калибратором CS5 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру CS5). Спектральный калибратор 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 спектрального калибратора CS5 добавить 50 мкл деионизированной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS5 и инкубировать при комнатной температуре 2 мин. Затем тщательно перемешать раствор на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием.

Готовый раствор можно хранить в темном месте при температуре +2 °C – +8 °C до 2 недель. Для более длительного хранения раствор следует заморозить. Следует избегать повторного размораживания.

### **Подготовка спектрального калибратора для калибровки**

Ni-Di™ формамид	160 мкл
Раствор CS5	16 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01- N02 96-луночного планшета. При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

### **Спектральная калибровка**

#### **Шаг А – Создание набора красителей для спектральной калибровки**

Открыть программу **GeneTest** на компьютере. Войти под пользователем Administrator и дождаться соединения программы **GeneTest** с генетическим анализатором Locus Seqtor 1616. Зайти во вкладку **Мониторинг прибора** и в выпадающем списке **Поддержка** выбрать **Матричные стандарты**. Из списка стандартов выбрать «E5» и на его основе создать новый набор красителей: нажать на **Сохранить как** и написать наименование нового набора красителей для спектральной калибровки, например, E5\_CS5. Подтвердить наименование и выйти из вкладки **Мониторинг прибора**.

#### **Шаг В – Создание модуля запуска для спектральной калибровки**

Зайти во вкладку **Управление методом** и в выпадающем списке выбрать **Модуль запуска**.

Выбрать кнопку **Создать** – откроется окно **Создать новый модуль**

В заголовке окна ввести данные:

Название модуля	например, SpecFragm-36cm_POP4
Тип модуля	SpectralCal
Метод	SpectralCal36_POP4

Ниже в окне ввести следующие параметры:

Параметр	Значение
CapFillVol	10000
Current Stability	5
Data Delay Time	1
Injection Time	18
Injection Voltage	1.2
LaserPower	15
Oven temperature	60
PreRun Time	180
PreRun Voltage	15
Run Time	1000
Run Voltage	15
VoltageNumberOfSteps	40
VoltageStepInterval	15

Нажать кнопку **Подтвердить**

### Шаг С – Создание планшета для спектральной калибровки

Зайти во вкладку **Управление методом** и в выпадающем списке выбрать **Управление планшетом**. В открывшемся окне выбрать **Новый планшет**  
Ввести следующие параметры:

Параметр	Значение
Название планшета	например, Spectral36_POP4_CS5
Владелец планшета	administrator
Тип запуска	SpectralCal
Тип планшета	96Well
Описание запуска	_____

Выбрать **Далее**.

Появится таблица, где необходимо ввести следующие параметры для позиций A01- H02 96-луночного планшета:

Параметр	Значение
Название образца	например, 01
Метка	E5_CS5
Модуль запуска, например,	SpecFragm-36cm_POP4
Набор	

Нажать кнопку **Подтвердить**, чтобы закончить создание планшета

## Шаг D – Проведение спектральной калибровки

Во вкладке **Управление методом** выбрать название созданного планшета (например, Spectral36\_POP4\_CS5).

Связать выбранное название с установленным в прибор планшетом. Запустить анализ планшета.

## Шаг E – Оценка результатов спектральной калибровки

После завершения работы прибора проверить статус каждого капилляра (pass или fail). Калибровка должна быть успешной минимум для 12 из 16 капилляров. При использовании CS5 в качестве спектрального калибратора в окне профиля калибровки должна отражаться следующая последовательность пиков: **синий-зеленый-желтый-красный-оранжевый**.

В случае успешной калибровки рекомендуется нажать на кнопку **Сохранить и установить, как действующую калибровку**.

В случае появления артефактов на электрофореграмме рекомендуется выбрать область вне артефактов через кнопку **Выбрать область кадра**.

## Условия капиллярного электрофореза

Перед проведением первого анализа продуктов амплификации COrDIS Cattle на генетическом анализаторе, необходимо создать соответствующий модуль запуска. Для этого перейти во вкладку **Управление методом** и в выпадающем списке выбрать **Модуль запуска**.

Выбрать кнопку **Создать** – откроется окно **Создать новый модуль**

В заголовке окна ввести данные:

Название модуля	например, COrDIS_Cattle
Тип модуля	GeneScan
Метод	GeneScan36_POP4

Ниже в окне ввести следующие параметры:

Параметр	Значение
CapFillVol	10000
Current Stability	5
Data Delay Time	1
Injection Time	15
Injection Voltage	1.2

LaserPower	15
Oven temperature	60
PreRun Time	180
PreRun Voltage	15
Run Time	1500
Run Voltage	15
VoltageNumberOfSteps	20
VoltageStepInterval	15

Нажать кнопку **Подтвердить**

## 6.2 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

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

<u>Компонент</u>	<u>Объем на один образец</u>
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1.0 мкл

При расчете объемов компонентов смеси следует учесть, что формамидом должны быть заполнены все лунки, в которых будет происходить инъекция, в том числе и лунки, не содержащие образцы.

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

**Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:**

<u>95°C</u>	<u>2 мин</u>
<u>4°C</u>	<u>1 мин</u>

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

## 6.3 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе Locus Spector 1616 проводится в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем. Для получения корректных результатов

необходимо создать соответствующую спектральную калибровку (см. раздел 6.1), **Run Module** (см. раздел 6.2).

### **Шаг А – Создание планшета**

Перед началом анализа необходимо создать протокол (планшет), описывающий расположение образцов на планшете и содержащий инструкции для прибора.

Зайти во вкладку **Управление методом** и в выпадающем списке выбрать **Управление планшетом**. В открывшемся окне выбрать **Новый планшет**  
Ввести следующие параметры:

<b>Параметр</b>	<b>Значение</b>
Название планшета	например, COrDIS_Cattle_[дата]
Владелец планшета	administrator
Тип запуска	GeneScan
Тип планшета	96Well
Описание запуска	_____

Выбрать **Далее**.

В таблице необходимо ввести параметры для анализируемых объектов:

<b>Параметр</b>	<b>Значение</b>
Название образца	например, Sample_1
Метка	E5_CS5
Модуль запуска, например,	COrDIS_Cattle

Нажать кнопку **Подтвердить** чтобы закончить создание планшета

### **Шаг В – Запуск прибора и информация о статусе прибора**

Во вкладке **Управление методом** выбрать название созданного планшета (например, COrDIS\_Cattle\_[дата]).

Связать выбранное название с установленным в прибор планшетом. Запустить анализ планшета.

Флуоресцентные профили образцов можно наблюдать в реальном времени в разделе **Данные текущего запуска**.

## 6.4 Оптимизация интенсивности сигналов

Для повышения интенсивности высоты пиков возможно увеличение вольтажа **Injection Voltage** до 3 kVolt.

Возможно усиление сигнала с помощью очистки ПЦР-продукта от праймеров и солей. Количество размерного стандарта в этом случае следует так же уменьшить.

## 7. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ «НАНОФОР 05»

При работе с генетическим анализатором Нанофор 05 необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

Для корректной визуализации флуоресцентных меток COrDIS Cattle Plus необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “CS5”, который должен быть создан пользователем в соответствии с пунктом 7.1 и откалиброван с использованием спектрального калибратора CS5.

### 7.1 Спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Cattle Plus на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным спектральным калибратором CS5 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру CS5). Спектральный калибратор 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 спектрального калибратора CS5 добавить 50 мкл деионизованной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS5 и инкубировать при комнатной температуре 2 мин. Затем тщательно перемешать раствор на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Готовый раствор можно хранить в темном месте при температуре +2 °C – +8 °C до 2 недель. Для более длительного хранения раствор следует заморозить. Следует избегать повторного размораживания.

#### 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 1x ТАПС буфера.
5. Залейте свежий буфер в контейнеры для катодного и анодного буфера, деионизованную воду – в контейнеры для воды и для слива.

### Подготовка спектрального калибратора

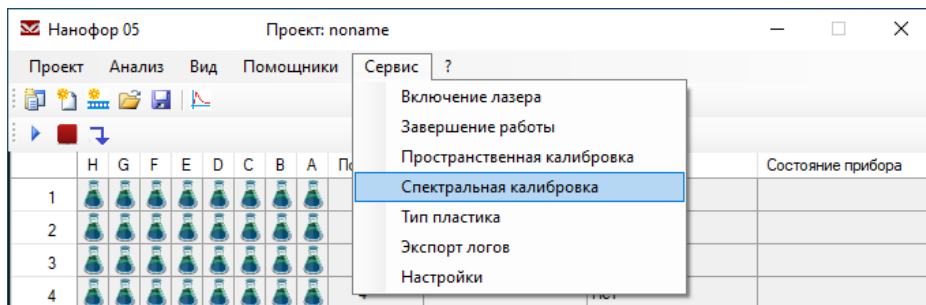
Hi-Di формаид	80 мкл
Раствор CS5	8 мкл

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

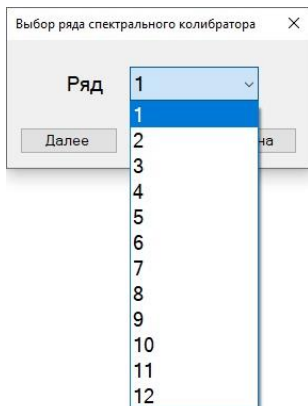
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

### Спектральная калибровка

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

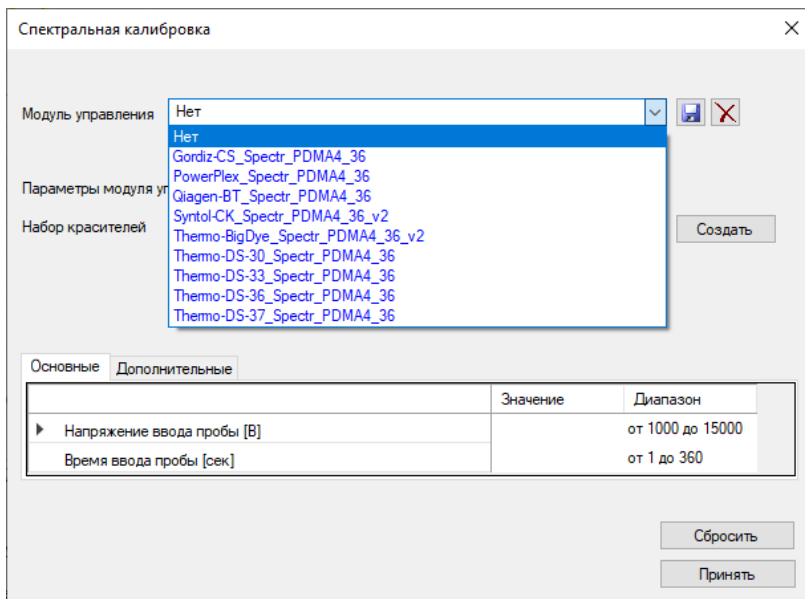


Появится окно **Выбор ряда спектрального калибратора**.



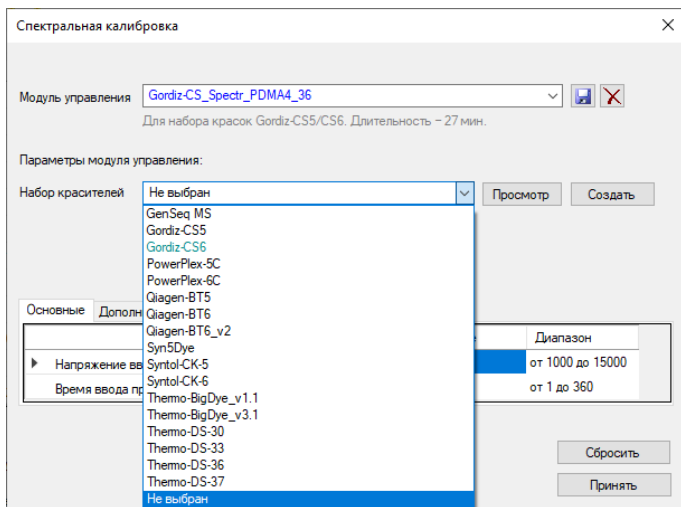
При нажатии кнопки **Далее** появляется окно **Спектральная калибровка**. В выпадающем списке нужно выбрать Модуль управления:

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

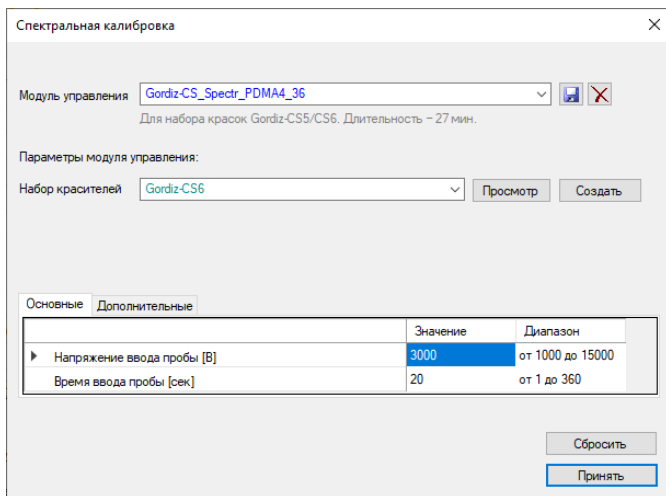


При необходимости в **Модуле управления** можно изменить параметры выбранной программы и сохранить его, либо оставить программу без изменений.

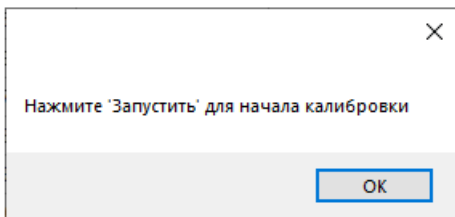
Из выпадающего списка **Набор красителей** выберите **Gordiz-CS5**.




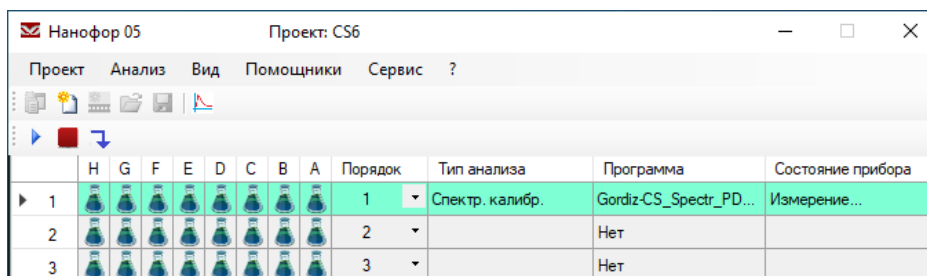
Появится окно Спектральная калибровка. Нажмите **Принять**.



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-CS5  
число красителей: 5

Калибры: 2023.05.24 14.05

показать все

Капилляр: 36 см, 1221575

Качество

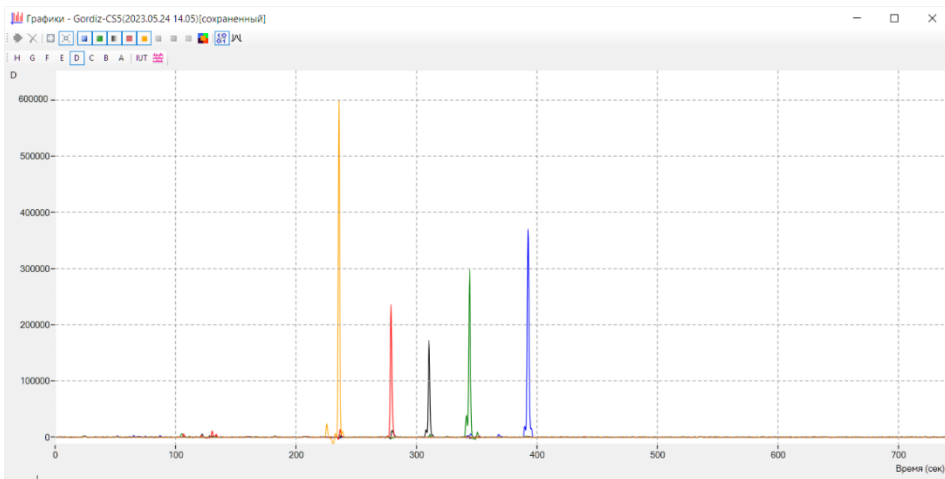
Графики

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

	СКО	Ошибки	Качество
Капилляр H	0,02		Хорошее
Капилляр G	0,01		Хорошее
Капилляр F	0,02		Хорошее
Капилляр E	0,01		Хорошее
Капилляр D	0,01		Хорошее
Капилляр C	0,02		Хорошее
Капилляр B	0,02		Хорошее
Капилляр A	0,01		Хорошее

Закреть

Типичный вид данных после применения матриц:



## 7.2 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.

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

### Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:

95°C	2 мин
4°C	1 мин

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

## 7.3 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

Имя проекта

Путь для резервного сохранения  ...

Пластик

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

Откроется главное окно **Описание проекта**.

Описание проекта: Project 1

Планшет Таблица

Тип образца  
Образец

Стандарт длин  
Нет

Имя файла  
<Name>

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

ПА - Программа Анализа

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 **FA\_450\_PDMA4\_36**

В графе **Набор красителей** выбрать **Gordiz-CS5**.

Программа анализа

Тип анализа:

Модуль управления:   

Параметры модуля управления:   
FA\_450\_PDMA4\_36  
FA\_600\_PDMA4\_36  
HID\_450\_PDMA4\_36  
HID\_600\_PDMA4\_36

Набор красителей:

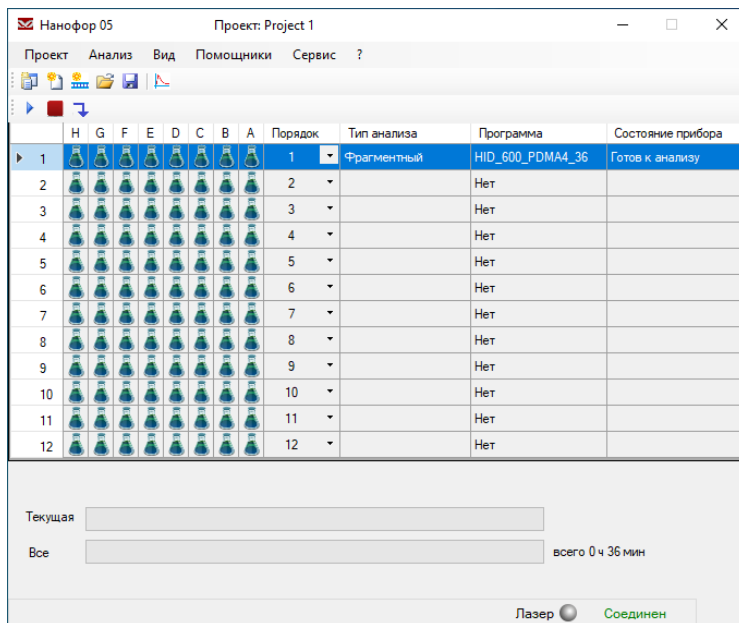
Калибровка:

Основные


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

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

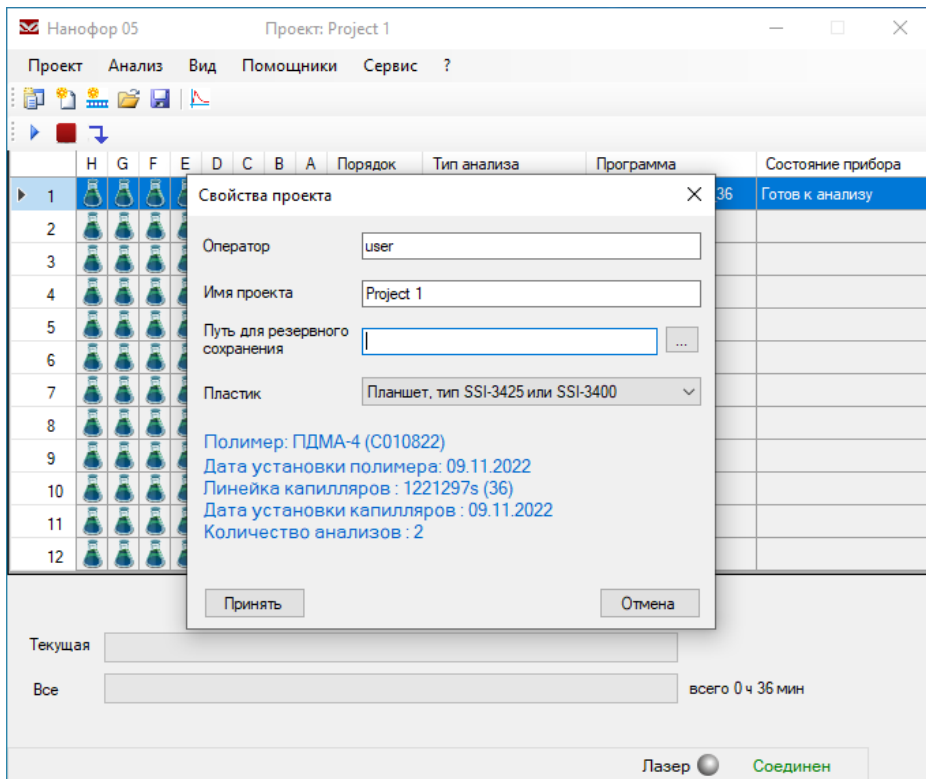
Нажать кнопку **Принять**. Откроется главное окно программы НАНОФОР 05 и в графе **Статус** в выбранном ряду проекта появится надпись **Готов к анализу**.



## 7.4 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 (5–20 сек.). 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.

## 8. АНАЛИЗ ДАННЫХ

Для получения конкордатных результатов необходимо придерживаться следующих этапов:

1. Проверить наличие соответствующей панели и бинов в программе для анализа результатов. При необходимости загрузить панель и бины;
2. Загрузить данные фрагментного анализа формата .fsa, .hid в новый проект;
3. Выбрать метод анализа (Analysis Method), панель (Panel) и размерный стандарт (Size standard);
4. Запустить анализ данных;
5. Проверить качество и корректность определения размерного стандарта в положительном контроле и образцах. При необходимости исправить размерный стандарт;
6. Провести выравнивание бинов по положительному контролю;
7. Запустить повторный анализ данных;
8. Проверить правильность определения положительного контроля;
9. Проверить отсутствие пиков в отрицательном контроле, кроме размерного стандарта.

Проведение анализа результатов возможно в любой программе, поддерживающей микросателлитный анализ в том числе в MacSTRo, GeneMapper, GeneMarker, Genmar. Подробно о проведении анализа указано в Инструкции к Программе.

### 8.1 Анализ результатов в программе MacSTRo

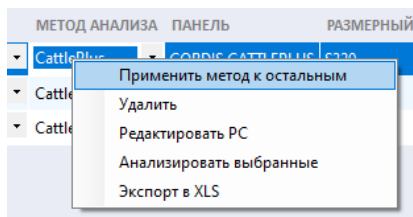
Для анализа данных в программе MacSTRo необходимо установить программу на компьютер согласно Руководству пользователя на сайте [gordiz.ru](http://gordiz.ru) в разделе «Программное обеспечение». После получения ключа программа активируется на вашем компьютере.

Для создания проекта в главном меню программы в разделе файл выберите пункт «Создать проект». Введите название проекта -> **ОК**.

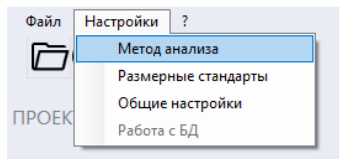
Добавьте анализируемые образцы. В главном окне программы нажмите кнопку «Добавить образец» ⊕ . Выделите необходимые образцы на диске и нажмите «Открыть».

В столбце «Тип» для положительного контроля выберите «K+(L)». Для остальных образцов оставить по умолчанию «Образец».

В столбце «МЕТОД АНАЛИЗА» выберите **CattlePlus** для первого образца, затем наведите курсор на «CattlePlus» -> правой кнопкой мыши -> «Применить метод к остальным».



Настройки Метода анализа можно проверить в «Настройках» -> «Метод анализа» -> «CattlePlus»



### Рекомендованные настройки:

Размерный стандарт: не ниже S320, возможно увеличение до S550

Глобальный фильтр: 20

Размер окна поиска пиков: 50

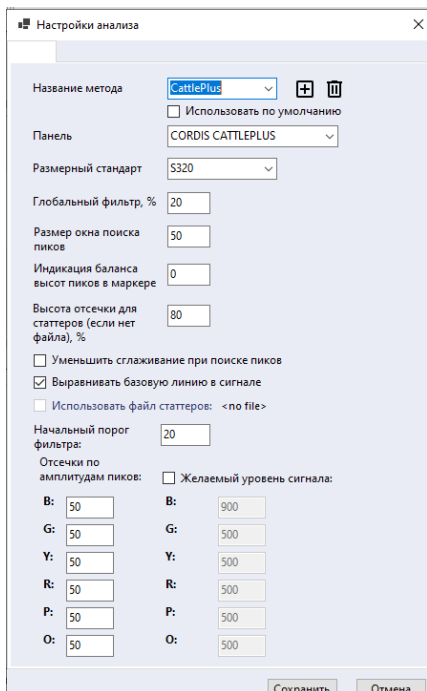
Индикация баланса высот пиков в маркере: 0

Высота отсечки для статтеров: не ниже 80%, возможно увеличение до 85%.

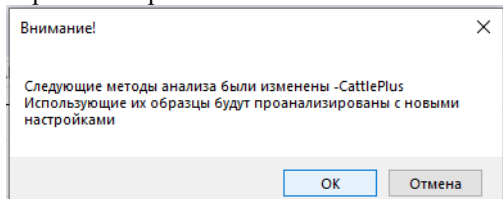
Начальный порог фильтра: 20


Отсечки по амплитудам пиков: от 50, при высоких значениях по оси Y этот показатель можно увеличить

Желаемый уровень сигнала: по умолчанию функция отключена




При сохранении настроек анализа все образцы в проекте, проанализированные ранее с использованием этого метода анализа, будут перепроанализированы.



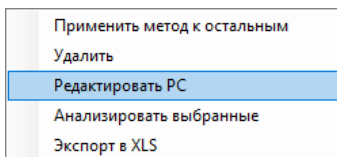
Для запуска анализа образцов нажмите на кнопку «**Запустить анализ**» на верхней панели . Дождитесь окончания анализа всех образцов. После завершения анализа на верхней панели появится информация о количестве файлов, образцов, лэддеров, контролей.

Проверьте «**Качество по РС**» и «**Качество анализа**» в контроле. Только при хорошем качестве размерного стандарта и хорошем качестве анализа в контроле, который используется как лэддер, можно переходить к анализу результатов образцов. Хорошее качество обозначается зеленым кругом.

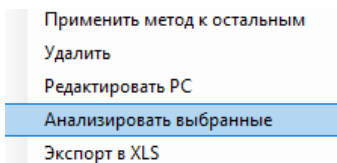
СТАТУС	ФАЙЛ	НАЗВАНИЕ ОБРАЗЦА	ТИП	МЕТОД АНАЛИЗА	ПАНЕЛЬ	РАЗМЕРНЫЙ СТАНДАРТ	КАЧЕСТВО ПО РС	КАЧЕСТВО АНАЛИЗА	
1	✓	lpc-plus-k5_D08_04_Gordiz.hid	lpc-plus-k5	K-(L)	CattlePlus	CORDIS CATTLEPLUS	S320	✓	✓

Если РС проанализирован некорректно (необходимо редактирование) в столбце «качество по РС» будет черный треугольник 


При плохом качестве анализа размерного стандарта его необходимо отредактировать, если это возможно. Для этого кликните на образец, затем кликните правой кнопкой мыши -> «Редактировать РС».



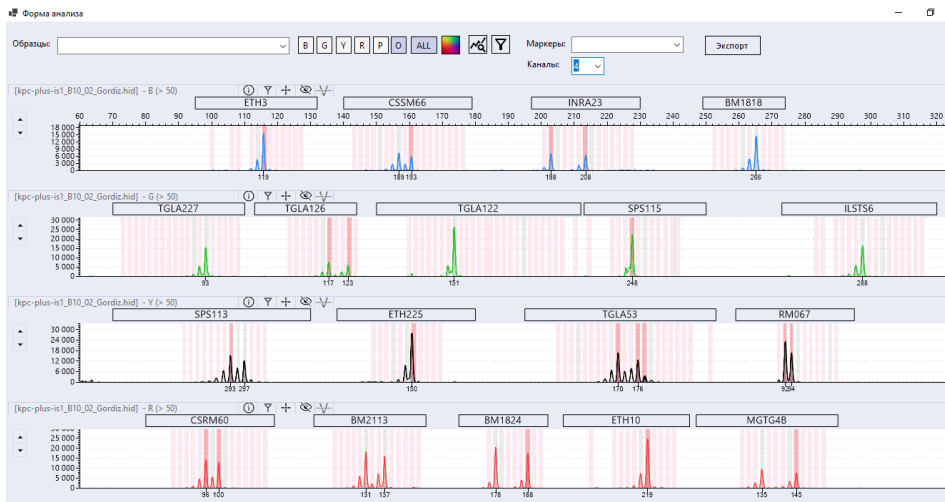
После редактирования РС нажмите кнопку **применить** и переанализуйте выбранный образец. Для этого **кликните на образец -> правой кнопкой мыши -> «Анализировать выбранные»**



Проанализировать результаты можно только для образцов с хорошим качеством по РС. Если редактирование невозможно, необходимо провести повторный форе́з.

Посмотреть результат форе́за можно кликнув два раза на образец либо нажать значок с лупой на верхней панели главного меню . Выставьте 4 канала просмотра.

Бины, которые совпадают с аллелем в контроле - серые. Все остальные бины воспринимаются программой как виртуальные и отображаются розовым. Аллели в образцах, которые не совпадают с контролем подсвечиваются малиновым.



Проанализируйте положительный контроль, отрицательный контроль, затем переходите к анализу образцов.

Проверьте правильность определения аллелей в образце, подпишите при необходимости или удалите аллели. Подробно инструменты «Формы анализа» описаны в Инструкции на сайте Gordiz.ru Отредактированные образцы в главном меню в столбце «Качество анализа» будут отображаться зеленым кружком с заливкой. После редактирования сохраните проект **Файл -> Сохранить как**.

Настройки экспорта располагаются в главном меню **Настройки-> Настройки экспорта**. В настройках можно выбрать создавать ли отдельный отчет для каждого образца или выводить общий отчет по всем образцам в файле. Так же возможно исключить не валидные результаты из отчета. Возможно выбрать формат обозначения образца и шрифт.

Экспортировать результаты можно в трех форматах: txt, pdf, Excel из главного меню и формы анализа фореграмм:

**Из главного меню: выбрать образцы -> Файл -> Экспорт -> TXT**

**Из формы анализа фореграмм: выбрать образцы -> Открыть окно анализа -> Экспорт -> выбрать формат**

- если необходим общий файл со всеми фореграммами выбираем PDF
- если необходима горизонтальная выгрузка данных - csv (Excel)
- если необходима вертикальная выгрузка данных – TXT

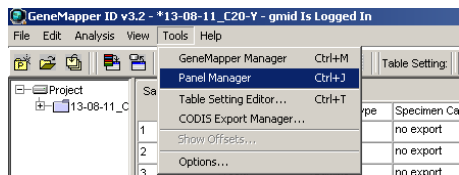
Подробная информация по программе находится в **Руководстве пользователя** на сайте gordiz.ru в разделе «**Программное обеспечение**».

## 8.2 Анализ результатов в программе GeneMapper

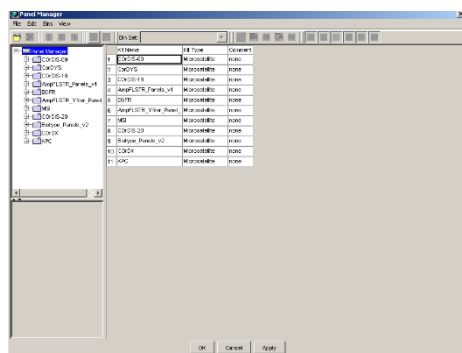
### Импорт файлов для анализа в программе GeneMapper ID 3.2

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

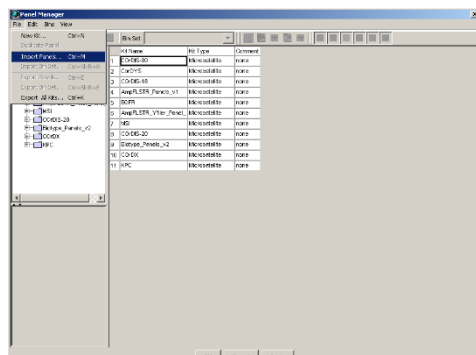
Выбрать пункт меню **Tools-> Panel Manager**.



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

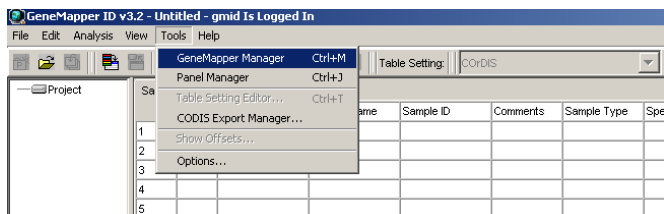


В меню выбрать **File-> Import panels....**

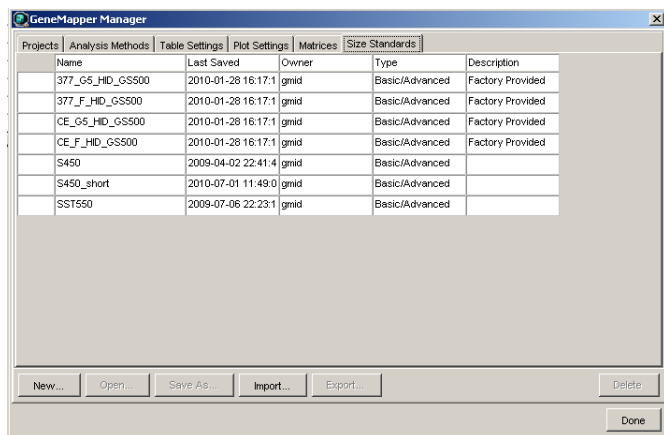


В открывшемся окне найти и выбрать файл с панелями (например файл COrDIS Cattle Plus). Загрузить нажатием кнопки **Import**.

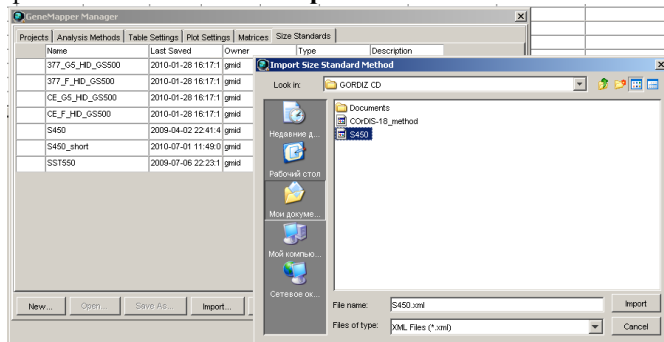
Выбрать пункт меню **Tools-> GeneMapper Manager**.



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



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



Перейти во вкладку **Analysis Method**, нажать кнопку **Import**, выбрать файл COrDIS\_Cattle\_Plus\_method, загрузить файл нажатием кнопки **Import**.


При анализе данных в GeneMapper использовать следующие параметры:

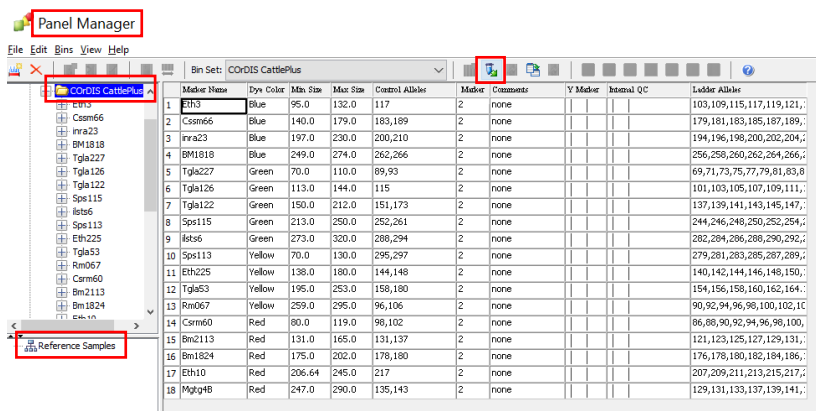
Параметр	Значение
Analysis Method	COrDIS_Cattle_Plus
Panel	COrDIS_Cattle_Plus
Size Standard	S550

При анализе в программе GeneMapper бины необходимо выровнять самостоятельно по положительному контролю.

Загрузите анализируемые образцы в новый проект. Выберите **Analysis Metod, Panel, Size Standards**. Запустите анализ.

Версии программы GeneMapper 4.0-6.0 позволяют проводить выравнивание бинов в режиме Display Plots (при просмотре фореграмм).

В версиях GeneMapper ID-X 1.2-1.6 выравнивание бинов проводится через команду **Panel Manager**. Необходимо выбрать нужную панель, навести курсор на **Reference samples**, выбрать положительный контроль последней постановки (**Add reference data** ) , добавить образцы положительного контроля (**Add to list-> Add**).



Marker Name	Dye	Color	Min Size	Max Size	Control Alleles	Marker	Comments	Y Marker	Internal QC	Ladder Allele
1	ETH3	Blue	95.0	132.0	117	2	none			103,105,115,117,119,121,...
2	Csm66	Blue	140.0	179.0	183,189	2	none			179,181,183,186,187,189,...
3	rra23	Blue	197.0	230.0	200,210	2	none			194,196,198,200,202,204,...
4	BM1818	Blue	249.0	274.0	262,266	2	none			256,258,260,262,264,266,...
5	Tgla227	Green	70.0	110.0	89,93	2	none			69,71,73,75,77,79,81,83,8...
6	Tgla126	Green	113.0	144.0	115	2	none			101,103,105,107,109,111,...
7	Tgla122	Green	150.0	212.0	151,173	2	none			137,139,141,143,145,147,...
8	Spst115	Green	213.0	250.0	252,261	2	none			244,246,248,250,252,254,...
9	Ist66	Green	273.0	320.0	286,294	2	none			282,284,286,288,290,292,...
10	Spst113	Yellow	70.0	130.0	295,297	2	none			279,281,283,285,287,289,...
11	Eth225	Yellow	138.0	180.0	144,148	2	none			140,142,144,146,148,150,...
12	Tgla53	Yellow	195.0	253.0	158,180	2	none			154,156,158,160,162,164,...
13	Rm067	Yellow	259.0	295.0	96,106	2	none			90,92,94,96,98,100,102,1...
14	Csm60	Red	80.0	119.0	98,102	2	none			86,88,90,92,94,96,98,100,...
15	Bm2113	Red	131.0	165.0	131,137	2	none			121,123,125,127,129,131,...
16	Bm1824	Red	175.0	202.0	178,180	2	none			176,178,180,182,184,186,...
17	Eth10	Red	206.64	245.0	217	2	none			207,209,211,213,215,217,...
18	Mgtp48	Red	247.0	290.0	135,143	2	none			129,131,133,137,139,141,...

Образец контроля отобразится под надписью **Reference samples**.

Panel Manager

File Edit Bins View Help

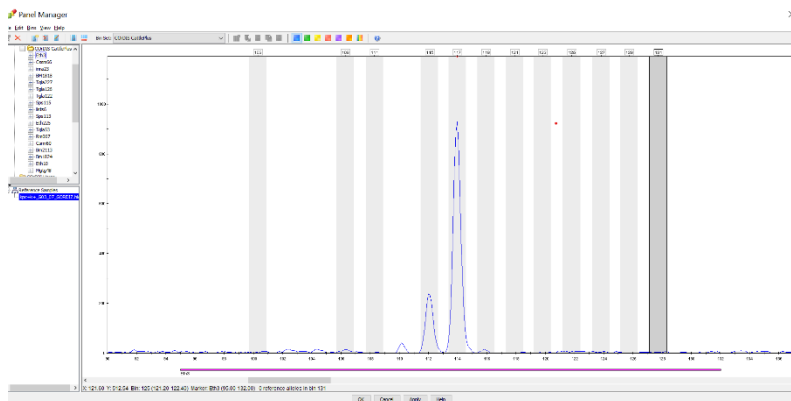
Bin Set: CO<sub>2</sub>DIS CattlePlus

Marker Name	Dye Color	Min Size	Max Size	Control Alleles	Marker	Comments	Y Marker	Internal QC	Ladder Alleles
1 Eth3	Blue	95.0	132.0	117	2	none			103,109,115,117,119,121,;
2 Csm66	Blue	140.0	179.0	183,189	2	none			179,181,183,185,187,189,;
3 Fra23	Blue	197.0	230.0	200,210	2	none			194,196,198,200,202,204,;
4 BM1818	Blue	249.0	274.0	262,266	2	none			256,258,260,262,264,266,;
5 Tgla227	Green	70.0	110.0	89,93	2	none			69,71,73,75,77,79,81,83,8
6 Tgla122	Green	113.0	144.0	115	2	none			101,103,105,107,109,111,;
7 Tgla126	Green	150.0	212.0	151,173	2	none			137,139,141,143,145,147,;
8 Spst115	Green	213.0	250.0	252,261	2	none			244,246,248,250,252,254,;
9 lkt56	Green	273.0	320.0	288,294	2	none			282,284,286,288,290,292,;
10 Spst113	Yellow	70.0	130.0	295,297	2	none			279,281,283,285,287,289,;
11 Eth225	Yellow	138.0	180.0	144,148	2	none			140,142,144,146,148,150,;
12 Tgla53	Yellow	195.0	253.0	158,180	2	none			154,156,158,160,162,164,;
13 Rm067	Yellow	259.0	295.0	96,106	2	none			90,92,94,96,98,100,102,10
14 Csm60	Red	80.0	119.0	98,102	2	none			86,88,90,92,94,96,98,100,
15 Bm2113	Red	131.0	165.0	131,137	2	none			121,123,125,127,129,131,;
16 Bm1824	Red	175.0	202.0	178,180	2	none			176,178,180,182,184,186,;
17 Eth10	Red	206.64	245.0	217	2	none			207,209,211,213,215,217,;
18 Mgc948	Red	247.0	290.0	135,143	2	none			129,131,133,137,139,141,;

Reference Samples

loc44\_G03\_07\_GOR012

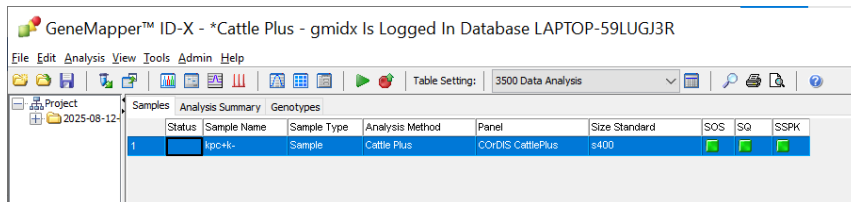
Выберите в панели локус, нажмите на референсный образец (добавленный положительный контроль), отключите лишние краски и сместите, при необходимости, все бины на соответствующие значения по оси X так, чтобы верхушка пика была в середине бина, определяющего этот аллель в положительном контроле. Остальные бины сдвигаются на соответствующее количество пар нуклеотидов. Чем длиннее фрагменты, тем, возможно, большее расстояние между бинами к концу локуса, поэтому расположение бинов можно также проверять по расположению статтеров.



После выравнивания всех бинов во всех маркерах сохранить панель (нажать **Apply**-> **OK**).

Запустите повторный анализ данных (▶)

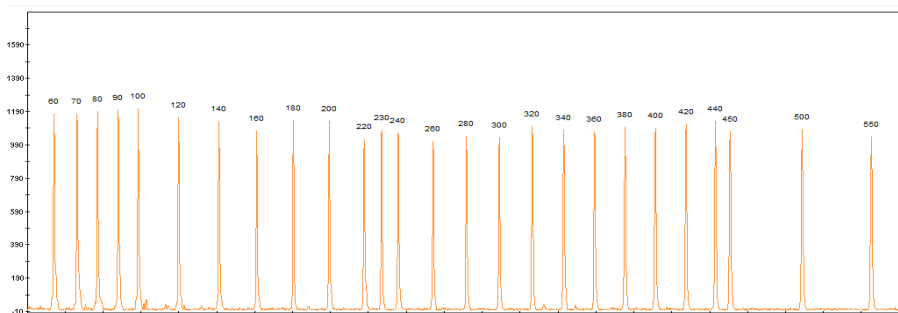
Для корректного определения длины фрагмента необходимо проверить правильность определения размерного стандарта в образцах. В программе GeneMapper корректность размерного стандарта определяется в столбце SQ (■).



### 8.3 Размерный стандарт S550

Ниже приводится пример электрофореграммы с сигналами фрагментов размерного 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 и 550.

Для получения полного генетического профиля по набору COrDIS\_Cattle\_Plus достаточно получить размерный стандарт до 320 п.н. Соответствующий размерный стандарт можно создать в программе: **Tools->GeneMapper Manager -> Size Standards-> New**



#### 8.4 Диапазоны размеров микросателлитных маркеров

Локус	Диапазон длин аллелей	Аллели КРС-5	Цвет метки
ETH3	95-132	117	Синий
CSSM66	140-179	183/189	Синий
INRA023	197-230	200/210	Синий
BM1818	249-274	262/266	Синий
TGLA227	70-110	89/93	Зеленый
TGLA126	113-144	115	Зеленый
TGLA122	150-212	151/173	Зеленый
SPS115	213-250	252/261	Зеленый
ILSTS006	273-320	288/294	Зеленый
SPS113*	70-130	151/153	Желтый
ETH225	138-180	144/148	Желтый
TGLA53	195-253	158/180	Желтый
RM067	259-295	96/106	Желтый
CSRM60	80-119	98/102	Красный
BM2113	131-165	131/137	Красный
BM1824	175-202	178/180	Красный
ETH10	206-245	217	Красный
MGTG4B	247-290	135/143	Красный

**Таблица 2** Диапазон длин аллелей.

Названия аллелей соответствуют исторически сложившейся номенклатуре и не привязано к диапазону длин аллелей, указанных для маркеров. Капиллярный электрофорез характеризуется изменением электрофоретической подвижности фрагментов и поэтому диапазон длины бинов может отличаться. Выравнивание бинов происходит по положительному контролю, который является референсным для каждого исследования.

\* Сложившаяся международная практика допускает использование двух различных номенклатур для обозначения аллельных вариантов локуса SPS113. Настоящий набор реагентов использует панель маркеров на основе распространённой международной номенклатуры ISAG (International Society of Animal Genetics). Правила конвертации значений установленных аллельных вариантов локуса SPS113 при использовании разных видов номенклатуры приведены в таблице:

ISAG	Альтернативная
135	279
137	281
139	283
141	285
143	287
145	289
147	291
149	293
151	295
153	297
155	299
157	301
159	303

Таблица 3 Соответствие номенклатур локуса SPS113.

### 8.5. Амплификация контрольной ДНК

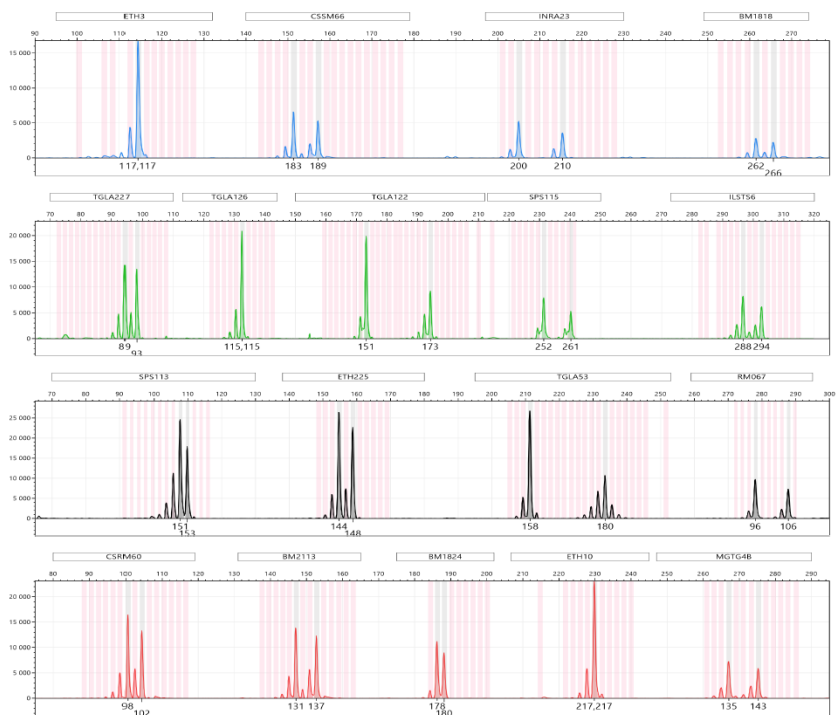
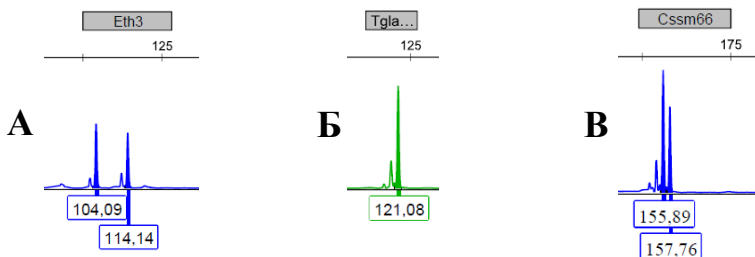


Рисунок 2 Контрольная ДНК КРС-5. В реакцию внесен 1нг контрольной ДНК

## 9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Каждому маркеру на электрофореграмме может соответствовать один или два ПЦР-продукта, что соответствует гомо- и гетерозиготному состоянию локуса. Разница в длине аллелей обычно кратна 2, что отражает различия в количестве динуклеотидных повторов. Для корректного определения генотипа необходимо учитывать природу статтеров. Статтеры – побочные продукты амплификации микросателлитных маркеров. Для динуклеотидных маркеров, к которым относятся все локусы набора COrDIS Cattle Plus, типичны статтеры размером -2 п.н. по отношению к основному продукту. Интенсивность сигнала статтера может достигать 80% от интенсивности продукта аллеля. При разнице в длине аллелей в 2 п.н. статтер более длинного аллеля накладывается на короткий аллель существенно увеличивая уровень его сигнала (Рисунок 3 В)



**Рисунок 3** А – Пример гетерозиготного генотипа 104/114 в локусе ETH3,  
Б – Пример гомозиготы 121 в локусе TGLA126,  
В – Пример гетерозиготы 155/157 в локусе CSSM66 с наложением статтера на аллель 155.

### Рекомендации по установлению родства согласно требованиям ISAG (Rules for conducting ISAG Comparison Tests (CT) for animal DNA testing)

1. При отсутствии расхождений в стандартной панели маркеров, рекомендованных ISAG – родство подтверждается.
2. При наличии одного отличия между предками и потомком в стандартной панели 12 маркеров необходимо протипировать маркеры дополнительной панели. Если подтвердится одно расхождение, следует считать это мутацией – родство подтверждается.
3. При наличии двух и более отличий в полной панели маркеров (стандартная панель + дополнительные маркеры) – родство исключается.

## 10. 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)

## 11. ВЕРСИЯ ДОКУМЕНТА

Версия документа	Дата	Описание	Раздел
250324	24.03.25	Первичная версия	
250715	15.07.25	Добавлено - набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах MiniAmp Thermal Cycler. - анализ данных может проводиться с использованием ПО GeneMarker (SoftGenetics).	Раздел 1. Информация о продукте Пункт 1.1. Описание продукта.
250815	15.08.25	Добавлено - протокол амплификации с использованием реагентов для быстрого лизиса COrDIS Sprint - этапы проведения анализа данных - рекомендации по установлению родства согласно требованиям ISAG	Раздел 3. ПЦР амплификация Пункт 3.2. Протокол амплификации с использованием реагентов для быстрого лизиса COrDIS Sprint Раздел 8. АНАЛИЗ ДАННЫХ Раздел 9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

251117	17.11.25	<p>-Добавлены рекомендуемые технические характеристики термоциклеров</p> <p>-Введены поправки по номенклатуре локуса SPS113</p>	<p>Раздел 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ. Пункт 1.1 Описание продукта</p> <p>Раздел 8. Анализ данных. Пункт 8.4. Диапазоны размеров микросателлитных маркеров</p>
251201	01.12.25	<p>-Диапазон концентраций ДНК для проведения амплификации</p> <p>-Добавлена программа анализа фореграмм</p>	<p>Раздел 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ Пункт 1.4. Основные характеристики набора</p> <p>Раздел 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ. Пункт 1.1 Описание продукта</p> <p>Раздел 8. АНАЛИЗ ДАННЫХ</p>
260401	01.04.26	<p>- Изменения в протоколе разведения сухого компонента Контрольная ДНК</p> <p>- Оптимизация программы амплификации для ускоренной ПЦР (с ЛОТ 26034 и далее). Использовать только с компонентом Раствор Активатора VN</p>	<p>Раздел 2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ Пункт 2.1 Контрольная ДНК</p> <p>Раздел 3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ Пункт 3.4 Условия амплификации</p>