COrDIS PIG

Набор реагентов для мультиплексного анализа 15-ти микросателлитных маркеров свиней

Инструкция пользователя

Оглавление

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ ____ 3

1.1 Описание продукта ____ 3
1.2 Компоненты набора и состав ____ 4
1.3 Условия хранения ____ 5
1.4 Основные характеристики набора ____ 5
1.5 Гарантии качества ____ 5
1.6 Сопутствующие материалы ____ 5

2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ ____ 6

2.1 Контрольная ДНК ____ 6
2.2 Размерный стандарт S550 ____ 6

3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ ____ 6

3.1 Постановка реакции ____ 6
3.2 Условия амплификации ____ 7

4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI 3130/3130XL ____ 8

4.1 Спектральная калибровка ____ 8
4.2 Условия капиллярного электрофореза ____ 10
4.3 Создание Instrument Protocol ____ 11
4.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации ____ 11
4.5 Запуск прибора ____ 12
4.6 Оптимизация интенсивности сигналов ____ 13

5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI 3500/3500XL ____ 13

5.1 Спектральная калибровка ____ 13
5.2 Создание Instrument Protocol ____ 15
5.3 Создание Assay ____ 16
5.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации ____ 16
5.5 Запуск прибора ____ 17
5.6 Оптимизация интенсивности сигналов ____ 18

6. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ LOCUS SEQTOR 1616 ____ 18

6.1 Спектральная калибровка ____ 18
6.2 Подготовка и загрузка продуктов амплификации ____ 21
6.3 Запуск прибора ____ 22
6.4 Оптимизация интенсивности сигналов ____ 23

7. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ «НАНОФОР 05» ____ 23

7.1 Спектральная калибровка ____ 23
7.2 Подготовка и загрузка продуктов амплификации ____ 29
7.3 Создание проекта ____ 29
7.4 Запуск анализа проекта ____ 32

8. АНАЛИЗ ДАННЫХ ____ 34

8.1 Анализ результатов в программе MaeSTRo ____ 34
8.2 Анализ результатов в программе GeneMapper ____ 37
8.3 Размерный стандарт S550 ____ 40
8.4 Диапазоны размеров микросателлитных маркеров ____ 41
8.5 Амплификация контрольной ДНК ____ 42

9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ____ 43

10. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ ____ 44

11. ВЕРСИЯ ДОКУМЕНТА ____ 44

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

1.1 Описание продукта

COrDIS PIG – набор реагентов для молекулярно-генетической характеристики свиней с целью анализа родства и ДНК-индивидуализации животных на основе мультиплексного ПЦР-анализа 15-ти локусов, содержащих короткие тандемные повторы (STR), известные также как микросателлитные локусы.

15 анализируемых STR-локусов составляют стандартную панель маркеров, рекомендованную Международным Обществом Генетики Животных (International Society of Animal Genetics - ISAG): S0005, S0090, S0101, S0155, S0227, S0228, S0355, S0386, SW24, SW240, SW72, SW857, SW911, SW936 и SW951. Все эти локусы представляют собой тандемные динуклеотидные повторы. Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 15-ти локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов <450 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 PIG используется три флуоресцентных красителя, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременной детекции в разных каналах флуоресценции. Праймеры мечены двумя флуоресцентными красителями, детектируемыми в каналах *Blue*, *Green*. Размерный стандарт S550 мечен третьим, флуоресцентным красителем и детектируется в отдельном канале *Orange* одновременно с продуктами ПЦР.

Для получения полного STR-профиля образца достаточно 1 нанограмма недеградированной ДНК. Оптимальное количество – 10 нанограмм.

Общий объем реакции составляет 25 мкл. Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 10 мкл.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах: GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, ProFlex PCR System, SimpliAmp™ Thermal Cycler, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, MiniAmp Thermal Cycler, BioRad T100 Thermal Cycler.

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

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

Таблица 1. Описание микросателлитных маркеров COrDIS PIG

Локус	Хромосомная локализация	Структура единицы повтора
S0386	11	$(TG)_n$
S0005	5	$(AC)_n$
S0355	15	$(AC)_n$
SW24	17	$(CA)_n$
SW72	3p	$(TG)_n$
S0101	7	$(GT)_nGAGTTT(GT)_n$
SW936	15	$(GT)_n$
S0228	6	$(AC)_n$
SW951	10	$(TG)_n$
SW857	14	$(TG)_n$
S0090	12	$(TG)_n$
S0155	1q	(GT)n
S0227	4	$(TG)_n$
SW240	2p	$(TG)_n$
SW911	9	$(AC)_n$

1.2 Компоненты набора и состав

1. Реакционная смесь — 1 пробирка, 1.0 мл
2. Раствор активатора — 1 пробирка, 0.5 мл
3. Деионизованная вода — 2 пробирки, 1.7 мл
4. Контрольная ДНК PIG-7, (лиоф.) — 1 пробирка, 20 реакций
5. Размерный стандарт S550, (лиоф.) — 1 пробирка, 120 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.

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

Контрольная ДНК PIG-7 представляет собой высокомолекулярную лиофилизированную геномную ДНК свиньи с известным генотипом по всем исследуемым локусам (Рис. 2). 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. Размерный 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

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 – 15
Список одновременно анализируемых локусов: S0005, S0090, S0101, S0155, S0227, S0228, S0355, S0386, SW24, SW240, SW72, SW857, SW911, SW936 и SW951.
Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 3
Оптимальное количество вносимой ДНК: 10 нг

1.5 Гарантии качества

Высокое качество каждого компонента набора проверено и контролируется в процессе производства. Каждый выпущенный лот регулярно проверяется на соответствие заявленным характеристикам в течение 18 месяцев.

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 20 мкл Деионизованной воды, поставляемой с набором в пробирку с сухой контрольной ДНК. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Для проведения ПЦР необходимо добавить 1 мкл контрольной ДНК в реакционную пробирку. Данный объем будет соответствовать 10 нг геномной ДНК. После разведения, контрольную ДНК необходимо хранить при температуре от +2°С до +8°С в течение месяца. Длительное хранение компонентов набора рекомендовано при температуре от -15°С до -25°С. 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°С до +8°С в течение месяца. Длительное хранение рекомендовано при температуре от -15°С до -25°С. Следует избегать многократного размораживания.

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

3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

3.1 Постановка реакции

В каждую пробирку необходимо внести 10 мкл Реакционной смеси и 5 мкл Раствора Активатора. Затем внести до 10 мкл раствора исследуемой геномной ДНК. Оптимальное количество вносимой ДНК – 10 нг. Вносимый объем ДНК зависит от ее концентрации. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет **10 мкл**. При необходимости довести общий объем реакции до 25 мкл Деионизованной водой, поставляемой в составе набора.

Компоненты набора	**Объем на 1 реакцию**
Реакционная смесь	10мкл
Раствор активатора	5 мкл
Геномная ДНК (10 нг)	до 10 мкл
Деионизованная вода, до конечного объем	25 мкл

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 PIG 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, ТЕ с ≤ 0,1 mM ЭДТА). Высокая концентрация ЭДТА в растворе ДНК может быть причиной снижения эффективности реакции вследствие хелатирования ионов магния.

После внесения всех компонентов, реакционную смесь необходимо тщательно перемешать 5–8 кратным пипетированием, либо используя вортекс. 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 PIG-7 + 9 мкл деионизованной воды + 10 мкл Реакционной смеси + 5 мкл Раствора активатора +) и один **отрицательный контроль** (10 мкл деионизованной воды + 10 мкл Реакционной смеси + 5 мкл Раствора активатора).

3.2 Условия амплификации

Приведённые ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных параметров. Важно соблюдение скорости нагрева **1°C/1 сек.** на этапе повышения с температуры с 57°C до 68°C. В связи с высокой сложностью амплификации с участием 13 пар праймеров **данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции**.

Параметры ПЦР:

94°C	3 мин	
95°C	10 сек	
57°C	30 сек	35 циклов
68°C*	60 сек	
68°C	6 мин 30 сек	
20°C	∞	

* Рекомендуемая скорость нагрева с 57°C до 68°C - не более 1°C/1 сек.

В случае, если используемая модель амплификатора не позволяет точно устанавливать скорость нагрева, рекомендуется воспользоваться секундомером для подбора рекомендуемой скорости.

4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI 3130/3130XL

При работе с генетическим анализатором и последующем анализе флуоресцентных профилей в программе MaeSTRo или GeneMapper™, необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

Для корректной визуализации пяти флуоресцентных меток COrDIS Pig необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей "**any5dyes**" с использованием спектрального калибратора CS5.

4.1 Спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Pig 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 (пробирка с бесцветной крышкой) 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 (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 для калибровки (ABI 3130XL/16 капилляров)

Hi-DiTM 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 A – Создание Instrument Protocol для спектральной калибровки

Открыть **Protocol Manager** в программе **Data Collection Software**
Зайти во вкладку **Instrument Protocol** и выбрать **New** чтобы открыть **Protocol Editor**
Ввести следующие параметры в окне **Protocol Editor** (**Instrument Protocol**):

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

Выбрать **OK** и закрыть **Protocol Editor**

Шаг B – 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 **OK**. 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. Вменю **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 **OK** чтобы закончить создание планшета и выйти из **Plate Editor.**

Шаг C – 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 Pig 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	10
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_Pig). 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:

Параметр	Значение
Name	Run36_ Pig
Type	REGULAR
Run Module*	COrDIS_Pig
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:

Компонент	Объем на один образец
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 инжекция, 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:

95°C	2 мин
4°C	1 мин

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

4.5 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 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 A Создание планшета

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

Параметр	Значение
Name	Например COrDIS_Pig _[*дата*]
Application	выбрать GeneMapper
Plate Type	96-Well

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

Шаг B Заполнение таблицы

Параметр	Значение
Sample Name	Название образца
Priority	обычно 100 (очередность анализа по возрастанию)
Sample Type	Sample / Positive Control / Neg. Control
Size Standard	S550
Panel	COrDIS_Pig
Analysis Method	Например, COrDIS_Pig
User-defined 1-3	
SNP Set	
Results Group	Выбрать соответствующий **Results Group**
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 Allelic Ladder / Positive Control / Negative Control.

Шаг С Запуск прибора и информация о статусе прибора

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

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

4.6 Оптимизация интенсивности сигналов

Для повышения интенсивности пиков возможно увеличение времени инжекции до 15 сек и/или увеличение вольтажа до 15 kV.

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

5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI 3500/3500XL

При работе с генетическим анализатором и последующем анализе флуоресцентных профилей в программе MaeSTRo или GeneMapper™, необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

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

5.1 Спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Pig 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 (пробирка с бесцветной крышкой) и инкубировать при комнатной температуре 2 мин. Затем тщательно перемешать раствор на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием.

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

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

Подготовка спектрального калибратора для калибровки (ABI 3500 /8 капилляров)

Hi-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 для калибровки (ABI 3500XL/ 24 капилляра)

Hi-DiTM 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 A – Создание Dye Set для спектральной калибровки

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

Dye Set Name	CS5
Chemistry	Matrix standard
Dye Set Template	G5 Template
Arrange Dyes	оставить без изменений
Parameters:	
Matrix Condition Number	20.0
Minimal Quality Score	0.8

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

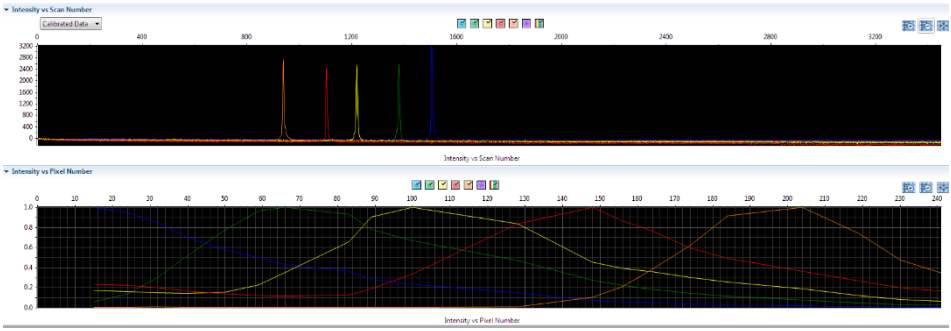
Шаг B – Проведение спектральной калибровки

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 C – 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:

Application Type	Fragment
Dye Set	CS5

Run Module	например “HID36_POP4” (выбрать протокол соответствующий параметрам системы)
Protocol Name	COrDIS_Pig

Нажать кнопку **Save**.

5.3 Создание Assay

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

Assay Name	COrDIS_Pig
Application Type	Fragment
Instrument Protocol	COrDIS_Pig

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:

Компонент	Объем на один образец
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 инжекция, 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 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 A 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_[*дата*]
Plate Type	Fragment

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

Шаг B Заполнение таблицы

Для всех анализируемых лунок планшета необходимо указать

Sample name	имя объекта
Sample type	тип образца (sample)
Assay	COrDIS (add from library – выбрать COrDIS)
Filename convention	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 или Gordiz)

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

Шаг C Запуск прибора и информация о статусе прибора

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

5.6 Оптимизация интенсивности сигналов

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

6. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ LOCUS SEQTOR 1616

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

6.1 Спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Pig 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.

Подготовка спектрального калибратора для калибровки

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 A – 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 B – 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 C – 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, Набор	SpecFragm-36cm_POP4

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 Pig 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_Pig
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:

Компонент	Объем на один образец
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 инжекция, 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:

95°C 2 мин
4°C 1 мин

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 Seqtor 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:

Параметр	**Значение**
Название планшета	например, COrDIS_Pig _[дата]
Владелец планшета	administrator
Тип запуска	GeneScan
Тип планшета	96Well
Описание запуска	_____

Выбрать **Далее**.

В таблице необходимо ввести параметры для анализируемых объектов:

Параметр	**Значение**
Название образца	например, Sample_1
Метка	E5_CS5
Модуль запуска, например, Набор	COrDIS_Pig

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_Pig _[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 Pig 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 Pig 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 1х ТАПС буфера.
5. Залейте свежий буфер в контейнеры для катодного и анодного буфера, деионизованную воду – в контейнеры для воды и для слива.

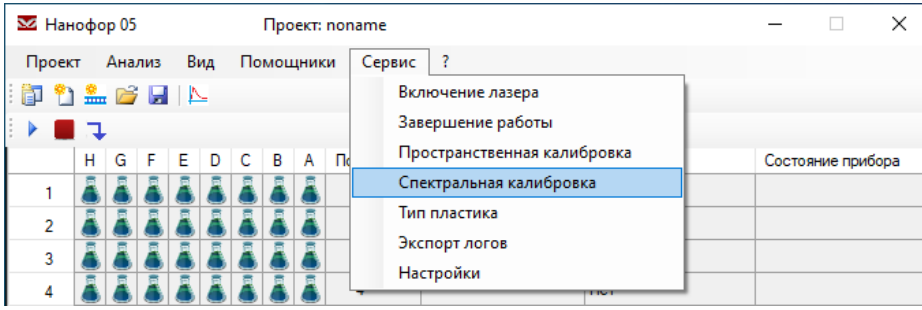
Подготовка спектрального калибратора для калибровки

Hi-Di формамид	80 мкл
Раствор CS5	8 мкл

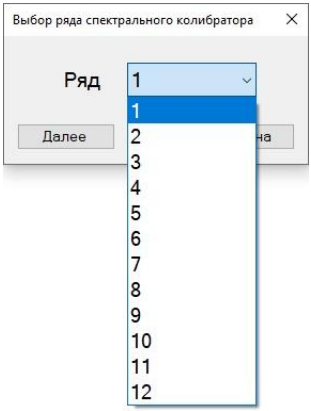
Добавить по 10 мкл смеси в лунки A-H 96-луночного планшета.
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

Спектральная калибровка

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

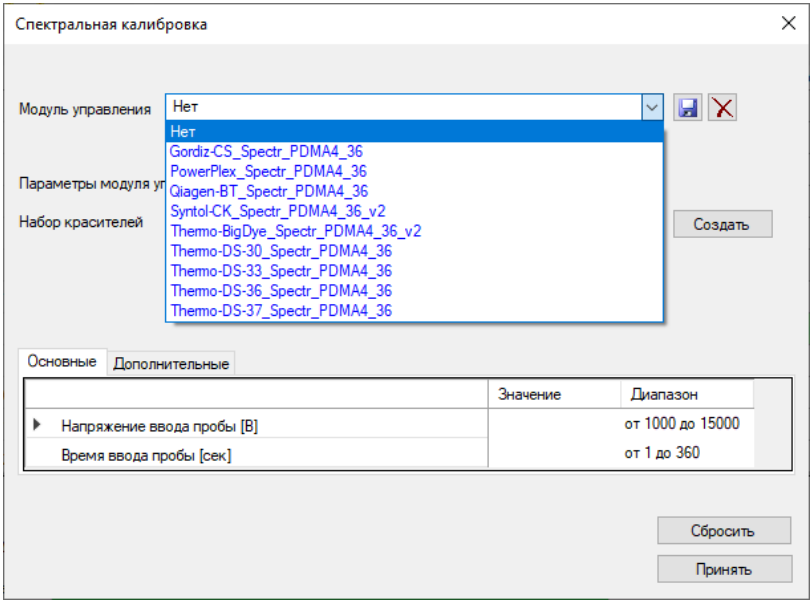


Появится окно **Выбор ряда спектрального калибратора.**



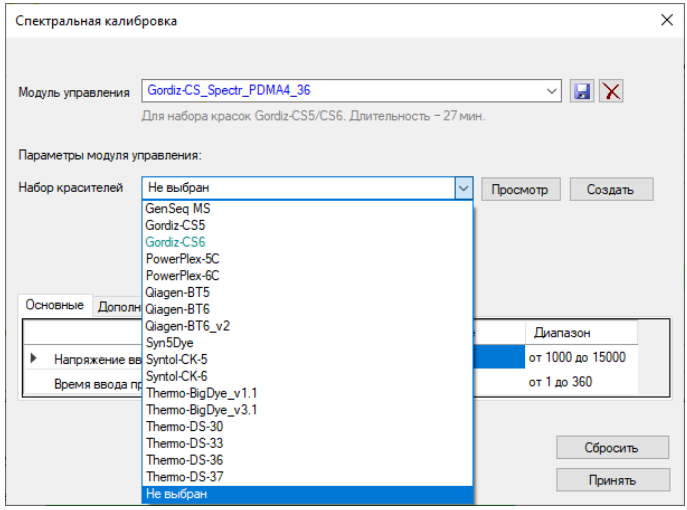
При нажатии кнопки **Далее** появляется окно **Спектральная калибровка.**
В выпадающем списке нужно выбрать Модуль управления**:**

Gordiz-CS_Spectr_PDMA4_36

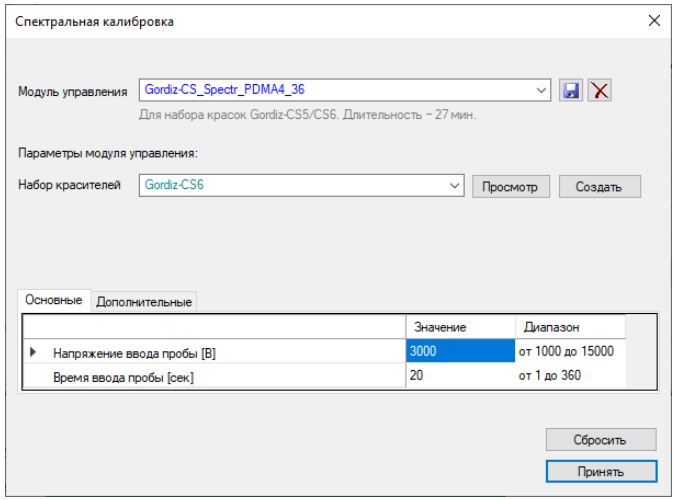


При необходимости в **Модуле управления** можно изменить параметры выбранной программы и сохранить его, либо оставить программу без изменений.

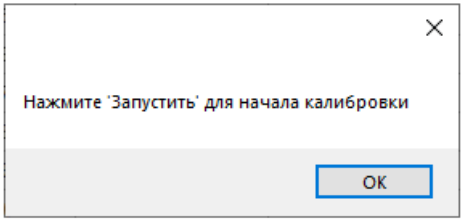
Из выпадающего списка **Набор красителей** выберите **Gordiz-CS5**.



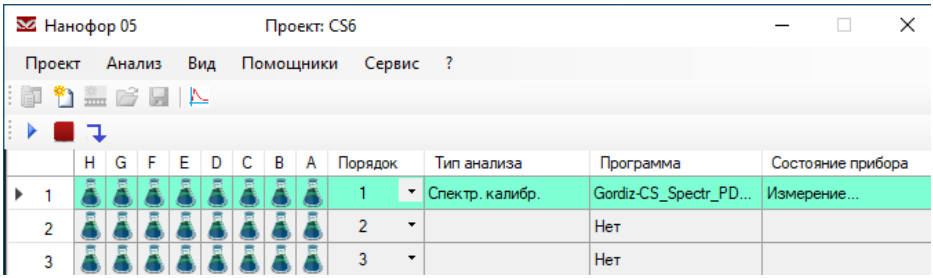
Появится окно Спектральная калибровка. Нажмите **Принять.**



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

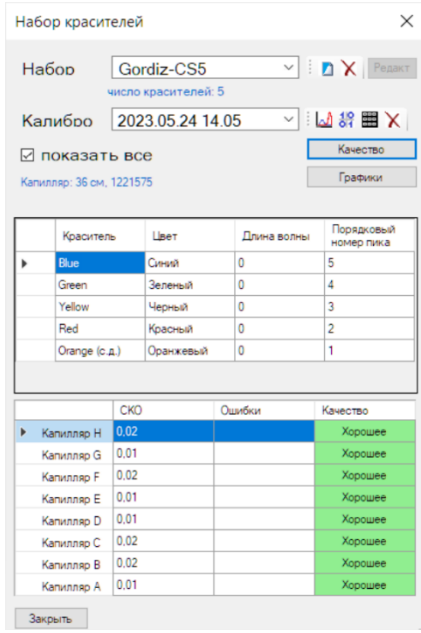


Для запуска спектральной калибровки в меню главного окна программы НАНОФОР 05 нажать кнопку **Запустить** или в пункте меню **Действия** выбрать опцию **Запустить**.

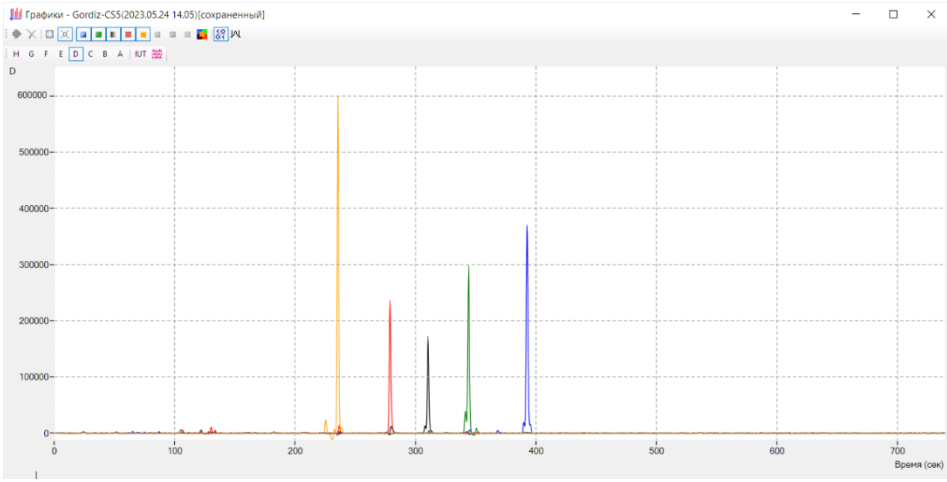


После завершения программы измерений данные анализируются автоматически. В результате открывается окно **Набор красителей** с рассчитанными оценками качества спектральной калибровки по каждому капилляру. Возможны три варианта оценки качества: **Хорошее**, **Удовлетворительное** и **Плохое**. В последнем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



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:

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 инжекция, 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.

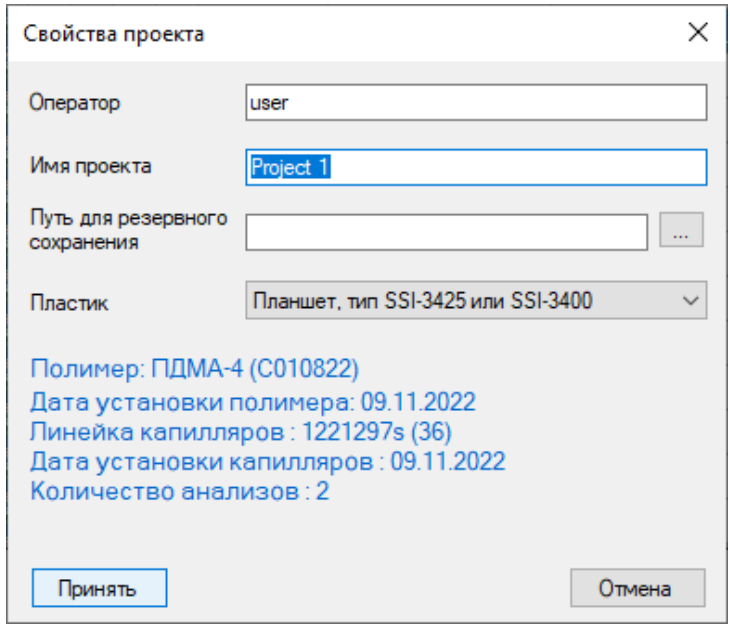
Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:

95°C	2 мин
4°C	1 мин

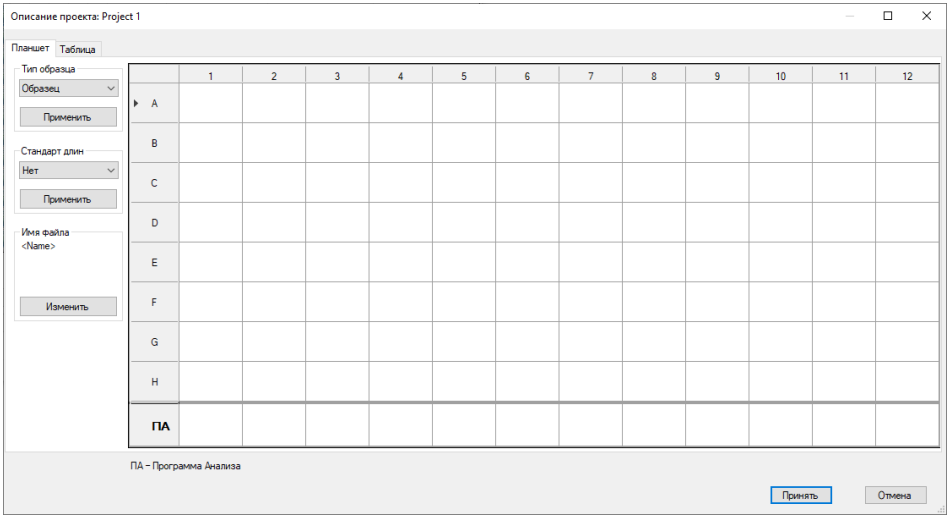
Загрузить планшет с денатурированными образцами в прибор в соответствии с инструкцией пользователя от производителя оборудования.

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**.



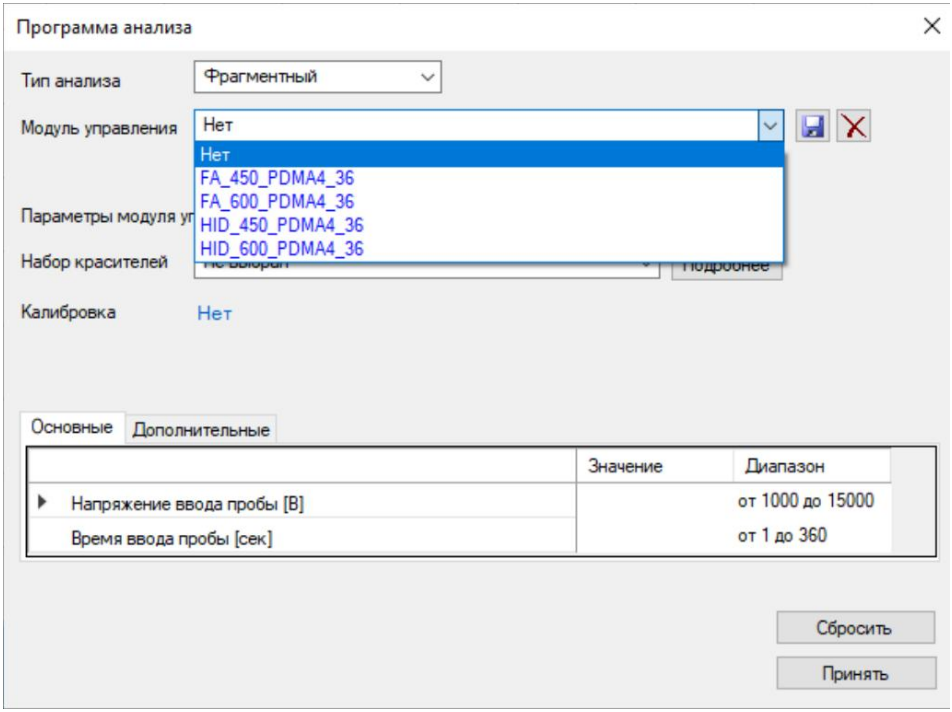
Откроется главное окно **Описание проекта**.



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

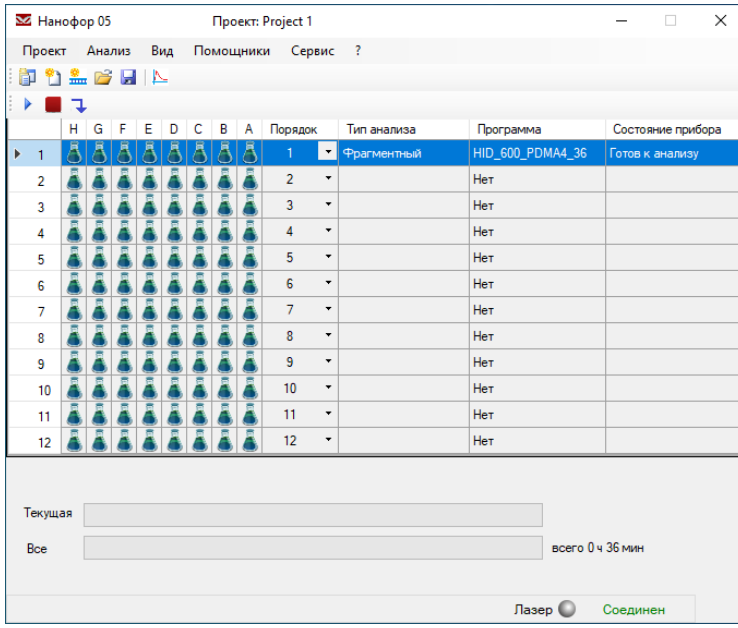
На поле ПА нужного ряда нажать на левую кнопку мыши два раза.
Откроется окно **Программа анализа**.

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.**



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

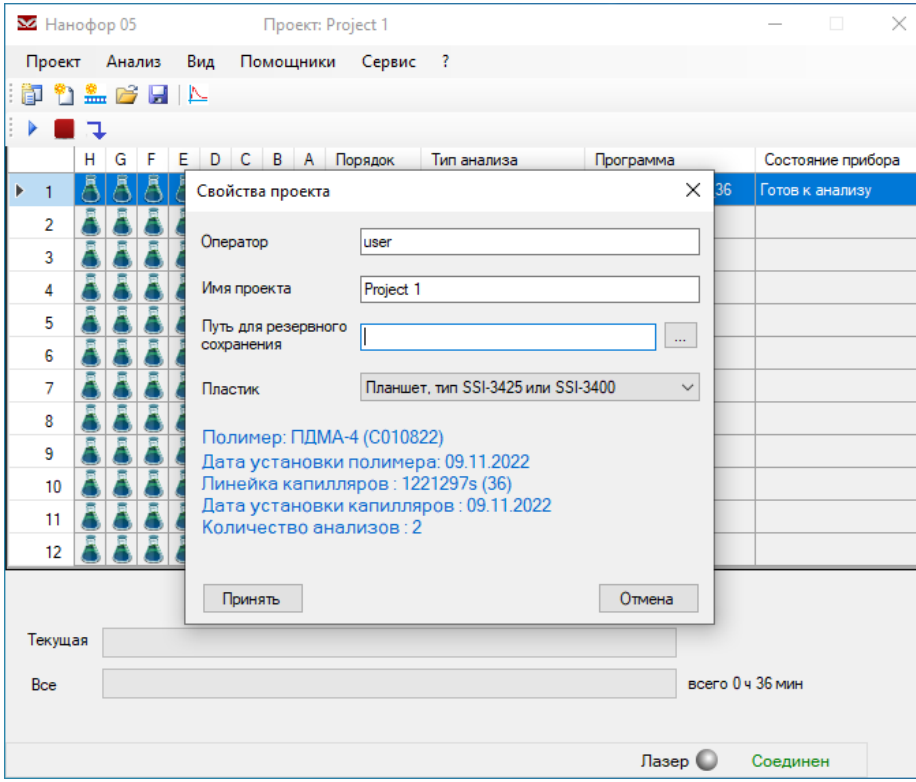
Нажать кнопку **Принять**. Откроется главное окно программы НАНОФОР 05 и в графе **Статус** в выбранном ряду проекта появится надпись **Готов к анализу**.



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 (5–15 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.

8. АНАЛИЗ ДАННЫХ

8.1 Анализ результатов в программе MaeSTRo

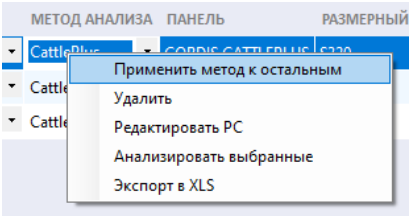
Для анализа данных в программе MaeSTRo необходимо установить программу на компьютер согласно Руководству пользователя на сайте gordiz.ru в разделе «Программное обеспечение». После получения ключа программа активируется на вашем компьютере.

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

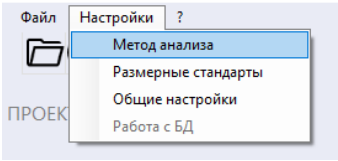
Добавьте анализируемые образцы. В главном окне программы нажмите кнопку «**Добавить образец**» ⊕. Выделите необходимые образцы на диске и нажмите «**Открыть**».

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

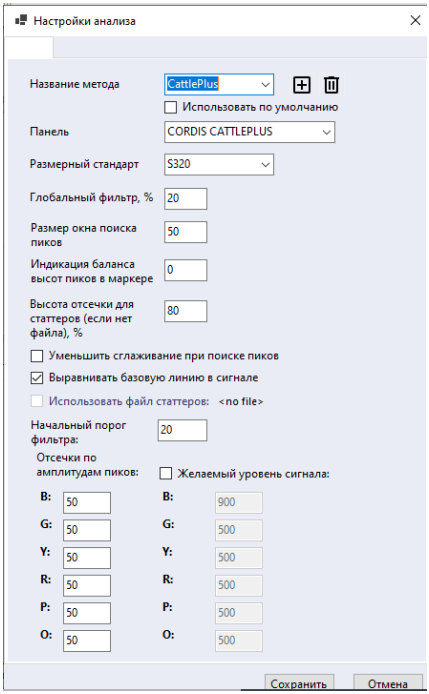
В столбце «**МЕТОД АНАЛИЗА**» выберете **Pig** для первого образца, затем наведите курсор на «**Pig**» -> правой кнопкой мыши -> «**Применить метод к остальным**».



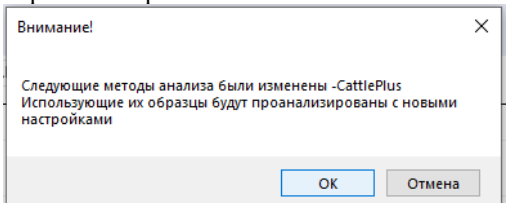
Настройки Метода анализа можно проверить в «**Настройках**» -> «**Метод анализа**» -> «**Pig**»



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

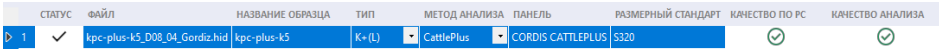


При сохранении настроек анализа все образцы в проекте, проанализированные ранее с использованием этого метода анализа, будут переанализированы.



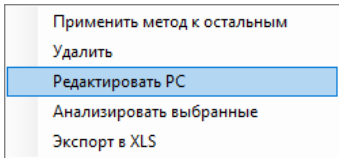
Для запуска анализа образцов нажмите на кнопку «**Запустить анализ**» на верхней панели . Дождитесь окончания анализа всех образцов. После завершения анализа на верхней панели появится информация о количестве файлов, образцов, лэддеров, контролей.

Проверьте «**Качество по PC**» 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

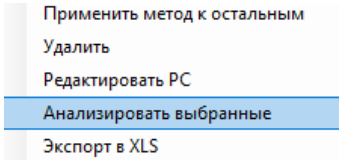


Если PC проанализирован некорректно (необходимо редактирование) в столбце «**качество по PC**» будет черный треугольник

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



После редактирования PC переанализируйте выбранный образец. Для этого **кликните на образец -> правой кнопкой мыши -> «Анализировать выбранные»**



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

Посмотреть результат фореза можно кликнув два раза на образец либо нажать значок с лупой на верхней панели главного меню. Выставите 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**.

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 необходимы отдельные файлы на каждый образец - PDFs
- если необходима горизонтальная выгрузка данных - csv (Excel)
- если необходима вертикальная выгрузка данных - TXT

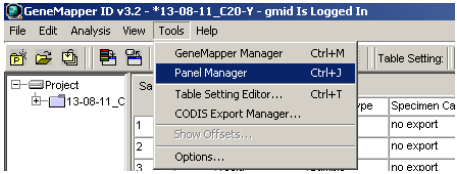
Подробная информация по программе находится в **Руководстве пользователя** на сайте gordiz.ru в разделе **«Программное обеспечение»**

8.2 Анализ результатов в программе GeneMapper

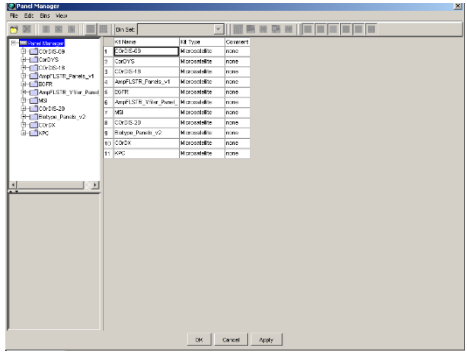
Импорт файлов для анализа в программе GeneMapper ID 3.2

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

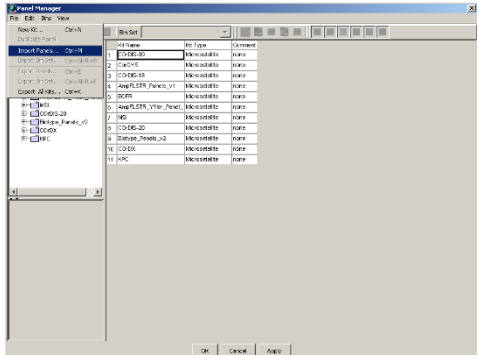
Выбрать пункт меню **Tools->Panel Manager**.



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

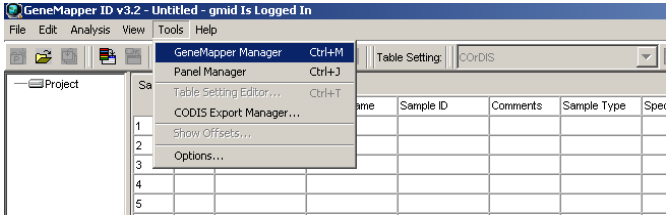


В меню выбрать **File->Import panels....**

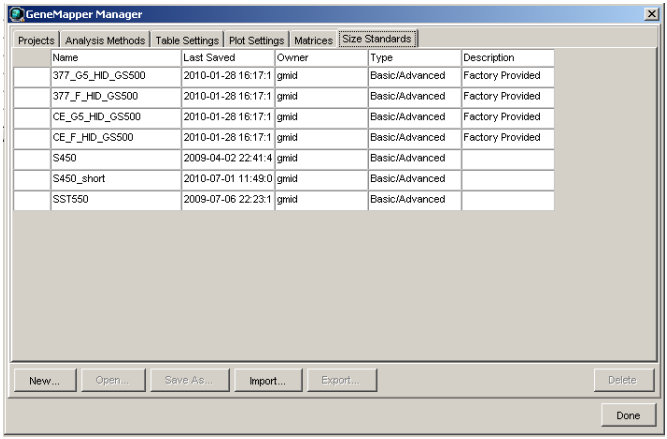


В открывшемся окне найти и выбрать файл с панелями (например файл COrDIS Pig). Загрузить нажатием кнопки **Import**.

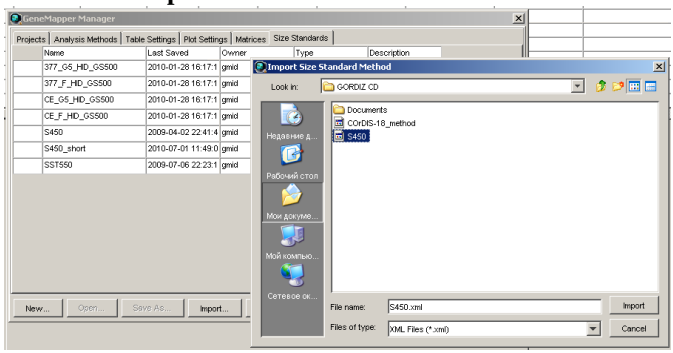
Выбрать пункт меню **Tools->GeneMapper Manager**.



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_Pig_method, загрузить файл нажатием кнопки **Import**.

При анализе данных в GeneMapper использовать следующие параметры:

Параметр	Значение
Analysis Method	COrDIS_Pig
Panel	COrDIS_Pig
Size Standard	S550

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.

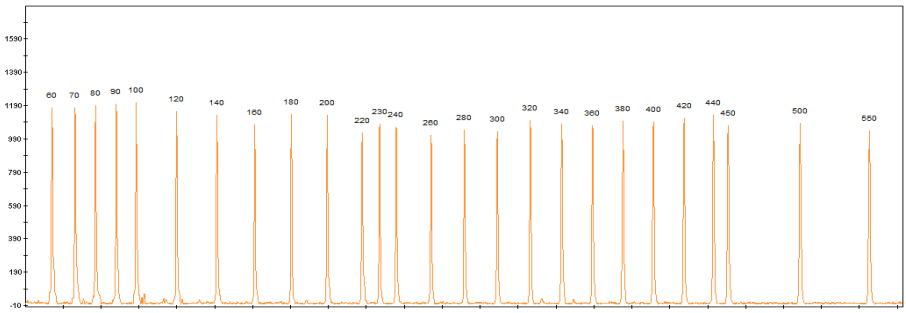


Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550. Размеры фрагментов.

8.4 Диапазоны размеров микросателлитных маркеров

Локус	Диапазон длин аллелей	Аллели PIG-7	Цвет метки
SW24	96-121	118/118	синий
S0101	197-216	212/214	синий
S0386	154-174	167/167	синий
S0005	205-248	227/251	синий
SW72	100-116	113/119	синий
S0090	244-251	246/246	синий
SW951	121-133	123/123	синий
SW936	80-117	96/108	зеленый
SW857	144-160	150/158	зеленый
S0355	243-277	247/247	зеленый
SW240	96-115	102/102	зеленый
S0228	222-249	226/232	зеленый
SW911	153-177	160/160	зеленый
S0227	231-256	232/232	зеленый
S0155	150-158	152/164	зеленый

8.5 Амплификация контрольной ДНК

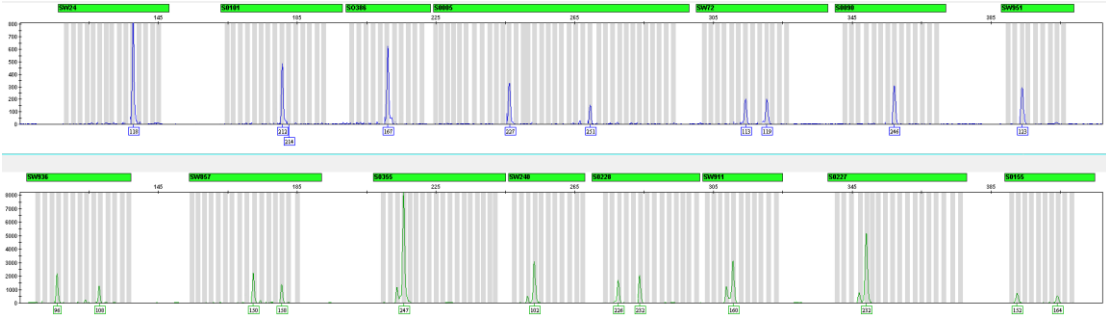


Рисунок 2 Контрольная ДНК PIG-7. В реакцию внесен 1 мкл контрольной ДНК.

9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

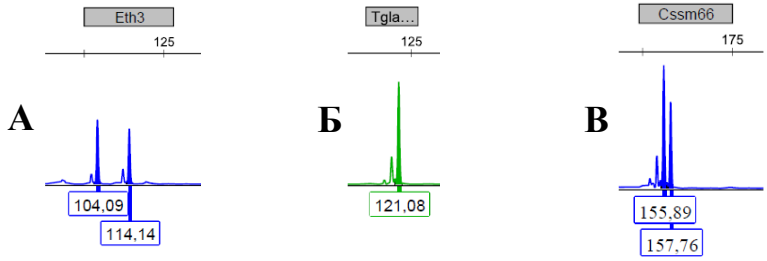


Рисунок 3 А – Пример гетерозиготного генотипа 104/114 в локусе ETH3,
Б – Пример гомозиготы 121 в локусе TGLA126,
В – Пример гетерозиготы 155/157 в локусе CSSM66 с наложением статтера на аллель 155.

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
e-mail: gordiz@gordiz.ru

11. ВЕРСИЯ ДОКУМЕНТА

Версия документа	Дата	Описание	Раздел
230706	06.07.23	Внесены рекомендации по этапу денатурации ПЦР продуктов	Раздел 4. Электрофорез на анализаторе ABI PRISM 3130/3130XL, пункт 4.4; Раздел 5. Электрофорез на анализаторе ABI PRISM 3500/3500XL, пункт 5.1
250129	29.01.25	Внесены дополнительные разделы	Раздел 6. Электрофорез на анализаторе LOCUS SEQTOR 1616 Раздел 7. Электрофорез на анализаторе «НАНОФОР 05» Раздел 8.1 Анализ результатов в программе MaeSTRo
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.