

Gene Profile Human+

Набор реагентов для идентификации личности по 29-ти STR локусам

ИНСТРУКЦИЯ по применению

Содержание

1.1. Описание набора	3
1.2. Область применения	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.....	5
2.1. Состав набора	5
2.1. Количество анализируемых проб	5
2.2. Условия хранения и транспортирования, срок годности.....	5
2.2. Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование	5
3. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	6
3.1. Подготовка к проведению реакции амплификации.....	6
3.2. Проведение амплификации.....	7
3.1. Прямая амплификация.....	7
3.1.1. Прямая амплификация буккального эпителия.....	7
3.1.1.1. Подготовка к проведению реакции амплификации.....	7
3.1.1.2. Проведение амплификации	8
3.1.2. Прямая амплификация панча ФТА-карты.....	8
3.1.2.1. Подготовка к проведению реакции амплификации.....	8
3.1.2.2. Проведение амплификации	9
4. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА НАНОФОР 05	10
4.1. Проведение спектральной калибровки	10
4.1.1. Подготовка раствора спектрального калибратора.....	10
4.1.2. Запуск спектральной калибровки СК-6	10
4.1. Подготовка продуктов амплификации.....	11
4.2. Запуск фрагментного анализа	12
5. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА АВ3500/АВ3500XL	13
5.1. Проведение спектральной калибровки	13
5.1.1. Создание DyeSets	13
5.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора.....	14
5.1.3. Запуск спектральной калибровки	15
5.2. Подготовка продуктов амплификации.....	16
5.3. Запуск фрагментного анализа	16
6. АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	17
6.1. Анализ данных в программе GeneMarker.....	17
6.1.1. Импорт файлов для анализа данных	17
6.1.2. Создание проекта анализа данных	18
6.1.3. Анализ размерного стандарта	19
6.1.3. Анализ аллельной лестницы	20
6.1.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)	22
6.1.5. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	22
6.1.6. Анализ образца.....	22
6.2. Анализ данных в Gene Mapper.....	22
6.2.1. Импорт файлов для анализа данных	22
6.2.2. Анализ данных	23
6.2.3. Анализ размерного стандарта	23
6.2.4. Анализ аллельной лестницы	23
6.2.5. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)	24
6.2.6. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	24
6.2.7. Анализ образца.....	24
7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	25

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание набора

Набор реагентов «GeneProfile Human» предназначен для генетической идентификации и определения родства человека.

В основе работы набора лежит мультиплексная амплификация 29-ти STR-локусов с последующим разделением ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза.

Из них 26 аутосомных локуса:

D3S1358, D2S441, D1S1656, D19S433, TPOX, D2S1338, TH01, D16S539, CSF1PO, D18S51, D21S11, D6S1043, D22S1045, D8S1179, VWA, D5S818, FGA, D13S317, D7S820, D12S391, D10S1248, SE33, DYS391, D8S1132, D7S1517, Penta D, Penta E

и 3 половых локуса:

Amelogenin, Yindel, DYS391

Представленные в наборе STR-локусы высоко полиморфны, что позволяет достоверно идентифицировать личность.

В набор входят все локусы баз данных CODIS (Combined DNA Index System) и ESS (European Standard Set), а так же локусы SE33, Penta D, Penta E.

Используемые в наборе праймеры мечены флуоресцентными красителями, детектируемыми в каналах Blue, Green, Yellow, Red, Purple. Стандарт длин СД-520 детектируется в канале Orange. Использование шести красителей позволяет одновременно детектировать продукты ПЦР и стандарт длин в одном капилляре.

Таблица 1. Характеристика STR локусов набора GeneProfile Human

Краситель	Локус	Хромосомная локализация	Диапазон аллелей	Аллельное состояние ПКО
FAM	Amelogenin	Xp22.1-22.3	X	X
		Yp11.2	Y	Y
	D3S1358	3p21.31	8-21	15, 17
	D2S441	2p14	8-17	10, 11
	D1S1656	1q42	8-21	18.3, 19.3
	D19S433	19q12	5.2-20	13, 15
	TPOX	2p25.3	4-16	8, 12
R6G	D2S1338	2q35	10-29	17, 26
	TH01	11p15.5	3-14	6, 9.3
	D16S539	16q24.1	4-16	12
	CSF1PO	5q33.1	5-16	10, 12
	D18S51	18q21.33	6-28.3	15, 16
	D21S11	21q21.1	12-41.2	30, 32.2
TAMRA	D6S1043	6q15	10-25	11, 20
	Yindel	Yq11.221	1-2	2
	D22S1045	22q12.3	7-20	14, 15
	D8S1179	8q24.13	4-20	13
	VWA	12p13.31	10-25	17, 18
	D5S818	5q23.2	6-19	10, 12
ROX	FGA	4q31.3	12.2-51.2	19, 24
	D13S317	13q31.1	5-17	11
	D7S820	7q21.11	5-16	8, 12

	D12S391	12p13.2	13-28	18.3, 20
	D10S1248	10q26.3	7-21	13, 14
	SE33	6q14	3-43	25.2, 27.2
Sy630	DYS391	Y	6-14	11
	D8S1132	8q	12.1-27	18, 22
	D7S1517	7q31.2	16-28	22, 25
	Penta D	21q22.3	2.2-17	9
	Penta E	15q26.2	5-25	5, 14

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 29 STR-локусов в одной пробирке. Размер амплифицируемых ПЦР продуктов находится в диапазоне от 60 до 460 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Наличие 15-ти mini-STR локусов позволяет получить более полный профиль у деградированных образцов. Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов (например Нанофор 05).

Для получения полного (по всем 29-ти STR-локусам) генотипа исследуемого образца достаточно 0,2 нанограмм (нг) не деградированной ДНК. Оптимальное количество ДНК, вносимой в реакцию, составляет 1 нг. Диапазон концентраций ДНК для проведения амплификации от 0,125 до 4 нг в реакцию.

Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 15 мкл. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Возможно проведение прямой амплификации с использованием FTA карт или образца буккального эпителия, обработанного реагентом «ГенПреп» (кат. № HG-504).

1.2. Область применения

Набор может быть использован в лабораториях, занимающихся идентификацией личности и установлением родства.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

2.1. Состав набора

№	Наименование	Состав	Объем, мкл	Количество, шт
1	РС	Реакционная смесь	1600	1
2	СП	Смесь специфических праймеров	400	1
3	ПКО ♂	Положительный контрольный образец – стабилизированный раствор ДНК человека мужского пола (0,5 нг/мкл)	75	1
4	СД-520	Стандарт 60, 70, 80, 100, 140, 180, 220, 240, 260, 300, 340, 380, 420, 460, 480, 500, 520)	400	1
5	Ал	Аллельная лестница	25	
6	Н ₂ О	Деионизованная Н ₂ О	1700	1

2.1. Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение 200 реакций, включая контрольные образцы.

2.2. Условия хранения и транспортирования, срок годности

Хранить в темноте.

Температура хранения – от -18 до -20°C.

Транспортирование – при температуре -18 до -20°C.

Срок годности набора – 14 месяцев при соблюдении условий хранения и транспортирования.

2.2. Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование

1. Спектральный калибратор СК-6.
2. Штатив для микропробирок 1,5 мл.
3. Пробирки 1,5 или 2,0 мл.
4. Штатив для 96-ти луночных ПЦР планшет или стрипов.
5. Дозатор переменного объема 1000, 200, 20 и 10 мкл.
6. Наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема 1000, 200, 20 и 10 мкл.
7. 96-ти луночные ПЦР планшеты или микропробирки в стрипах для ПЦР
8. Пленка для 96-ти луночных ПЦР планшет или крышки к микропробиркам в стрипах.
9. Центрифуга-вортекс для пробирок объемом 1,5 или 2 мл (Циклотемп-901).
10. Центрифуга для 96-ти луночных ПЦР планшет.
11. Прибор для проведения ПЦР.
12. Полимер для проведения капиллярного электрофореза (ПДМА-4, ПДМА-6)
13. Буфер для проведения капиллярного электрофореза (ТАПС)
14. Деионизованный формамид
15. Автоматический генетический анализатор (Нанофор 05)

3. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

Для приготовления рабочей реакционной смеси рассчитать требуемое количество реагентов РС и СП исходя из таблицы и количества образцов:

Таблица 2. Расчет рабочей реакционной смеси

Реагент	Расход реагентов на 1 реакцию для 25 мкл	Расход реагентов на 1 реакцию для 12,5 мкл	Расход реагентов на 1 реакцию для 10 мкл
РС	8	4	3,2
СП	2	1	0,8
ДНК	от 2 до 15	от 2 до 7,5	от 2 до 6
H ₂ O	до объема 25	до объема 12,5	до объема 10

ВАЖНО!!! Оптимальным количеством ДНК, вносимым в реакцию для 25 мкл является 0,5-1 нг, для 12,5 мкл – 0,5 нг, для 10 мкл – 0,3 нг.

ПРИМЕЧАНИЕ! С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контрольный образец (ПКО) и один отрицательный контрольный образец (ОКО). В качестве отрицательного контрольного образца используется деионизированная H₂O.

Включите в расчеты приготовления рабочей реакционной смеси дополнительную реакцию для компенсации погрешности пипетирования.

1. Разморозить пробирки с РС, СП, ПКО и ОКО перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
2. В отдельной чистой пробирке подходящего объема смешать необходимое количество РС и СП (согласно таблице 2), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Внести в лунку планшета или стрипа приготовленную рабочую реакционную смесь.
4. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести на стенку лунки планшета или стрипа исследуемый образец.
5. В одну из лунок планшета или стрипа с приготовленной рабочей реакционной смесью внести 2 мкл ОКО (отрицательный контрольный образец).
6. В другую лунку планшета или стрипа внести:
 - Для 25 мкл реакции:
 - для 30 циклов – 2 мкл ПКО.
 - для 32 циклов – 1 мкл ПКО.
 - Для 12,5 мкл реакции:
 - для 30 циклов – 1 мкл ПКО.
 - для 32 циклов – 0,5 мкл ПКО.
 - Для 10 мкл реакции:
 - для 30 циклов – 1 мкл ПКО.
7. Закрыть лунки планшета или стрипа.
8. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

3.2. Проведение амплификации

Поместить пробирки в прибор для ПЦР. Убедиться, что крышки пробирок плотно закрыты и запустить программу амплификации:

Температура	Время	Препарат ДНК	
		0,4-2 нг	менее 0,4 нг
95°C	2 мин		
95°C	5 сек	30 циклов	32 цикла
62°C	90 сек		
57°C	20 мин		

ПРИМЕЧАНИЕ! Для предотвращения образования -п фрагментов время финальной элонгации при 57°C можно увеличить с 20 до 25 минут.

ПЦР-продукты можно хранить неделю в защищенном от света месте при 2...8°C. В случае длительного хранения при -20°C.

3.1. Прямая амплификация

3.1.1. Прямая амплификация буккального эпителия

3.1.1.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

Возможно проведение прямой амплификации образца буккального эпителия, собранного на зонд-тампон и обработанного реагентом «ГенПреп» (кат. № HG-504).

Для приготовления рабочей реакционной смеси рассчитать требуемое количество реагентов **РС** и **СП** исходя из таблицы и количества образцов:

Таблица 3. Расчет рабочей реакционной смеси для прямой амплификации буккального эпителия.

Реагент	Расход реагентов на 1 реакцию для 25 мкл	Расход реагентов на 1 реакцию для 12,5 мкл	Расход реагентов на 1 реакцию для 10 мкл
РС	8 мкл	4 мкл	3,2 мкл
СП	2 мкл	1 мкл	0,8 мкл
ДНК	5 мкл	3-5 мкл	3 мкл
H₂O	10 мкл	до 12,5 мкл	3 мкл

ПРИМЕЧАНИЕ! С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контрольный образец (**ПКО**) и один отрицательный контрольный образец (**ОКО**). В качестве отрицательного контрольного образца используется деионизированная H₂O.

Включите в расчеты приготовления рабочей реакционной смеси дополнительную реакцию для компенсации погрешности пипетирования.

- Разморозить пробирки с **РС**, **СП**, **ПКО** и **H₂O**, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
- В отдельной чистой пробирке подходящего объема смешать необходимое количество **РС** и **СП** (согласно таблице 3), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
- Внести в лунку планшета или стрипа приготовленную рабочую реакционную смесь.
- Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести на стенку лунки планшета или стрипа 5 мкл исследуемого образца (лизат буккального эпителия).
- В одну из лунок планшета или стрипа с приготовленной рабочей реакционной смесью внести **2 мкл ОКО** (отрицательный контрольный образец).

14. В другую лунку планшета или стрипа внести:
 для **25 мкл реакции – 6 мкл ПКО**.
 для **12,5 мкл реакции – 3 мкл ПКО**
 для **10 мкл реакции – 3 мкл ПКО**
15. Закрыть лунки планшета или стрипа.
16. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

3.1.1.2. Проведение амплификации

Поместить пробирки в прибор для ПЦР. Убедиться, что крышки пробирок плотно закрыты, и запустить программу амплификации:

Температура	Время	Образец буккального эпителия
95°C	2 мин	3 цикла
95°C	5 сек	
64°C	90 сек	
95°C	5 сек	23-24 цикла
62°C	90 сек	
57°C	40 мин	

ПРИМЕЧАНИЕ! При использовании амплификатора 9700 необходимо использовать mode 9600.

ПЦР-продукты можно хранить неделю в защищенном от света месте при 2...8°C. В случае длительного хранения – при -20°C.

3.1.2. Прямая амплификация панча FTA-карты

3.1.2.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

Возможно проведение прямой амплификации панча FTA-карты диаметром 1-1,2 мм

Для приготовления рабочей реакционной смеси рассчитать требуемое количество реагентов **РС** и **СП** исходя из таблицы и количества образцов:

Таблица 4. Расчет рабочей реакционной смеси для прямой амплификации панча FTA-карты.

Реагент	Расход реагентов на 1 реакцию для 25 мкл	Расход реагентов на 1 реакцию для 12,5 мкл
РС	8 мкл	4 мкл
СП	2 мкл	1 мкл
Панч	1 шт	1 шт
H₂O	15 мкл	7,5 мкл

ПРИМЕЧАНИЕ! С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контрольный образец (**ПКО**) и один отрицательный контрольный образец (**ОКО**). В качестве отрицательного контрольного образца используется деионизированная H₂O.

Включите в расчеты приготовления рабочей реакционной смеси дополнительную реакцию для компенсации погрешности пипетирования.

17. Разморозить пробирки с **РС**, **СП**, **ПКО** и **H₂O**, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.

18. В отдельной чистой пробирке подходящего объема смешать необходимое количество РС и СП (согласно таблице 4), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
19. Внести в лунку планшета или стрипа приготовленную рабочую реакционную смесь.
20. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести на стенку лунки планшета или стрипа 5 мкл исследуемого образца (лизат буккального эпителия).
21. В одну из лунок планшета или стрипа с приготовленной рабочей реакционной смесью внести **2 мкл ОКО** (отрицательный контрольный образец).
22. В другую лунку планшета или стрипа внести:
 - для **25 мкл реакции** – **6 мкл ПКО**.
 - для **12,5 мкл реакции** – **3 мкл ПКО**
23. Закрыть лунки планшета или стрипа.
24. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

3.1.2.2. Проведение амплификации

Поместить пробирки в прибор для ПЦР. Убедиться, что крышки пробирок плотно закрыты, и запустить программу амплификации:

Температура	Время	Образец буккального эпителия
95°C	2 мин	3 цикла
95°C	5 сек	
64°C	90 сек	
95°C	5 сек	23-24 цикла
62°C	90 сек	
57°C	40 мин	

ПРИМЕЧАНИЕ! При использовании амплификатора 9700 необходимо использовать mode 9600.

ПЦР-продукты можно хранить неделю в защищенном от света месте при 2...8°C. В случае длительного хранения – при -20°C.

4. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА НАНОФОР 05

Для получения полного STR-профиля проводится фрагментный анализ – электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «Gene Profile Human».

4.1. Проведение спектральной калибровки

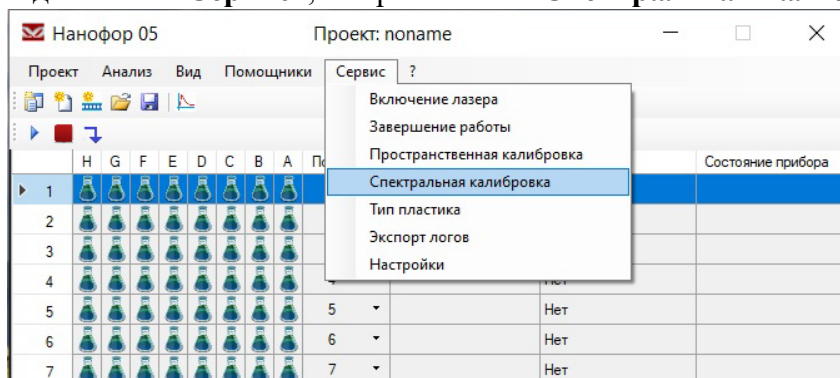
Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 6-ти цветным калибратором СК-6.

4.1.1. Подготовка раствора спектрального калибратора

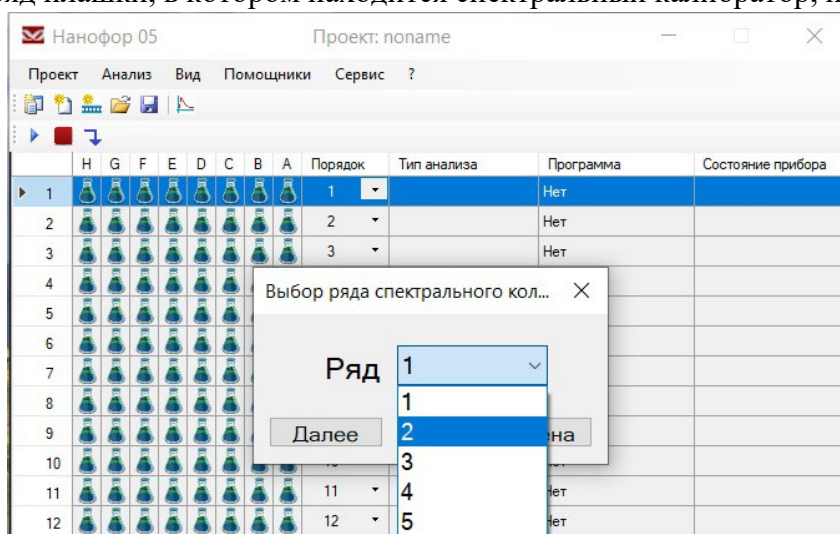
1. В отдельной пробирке смешать 80 мкл Ди-формамида и 10 мкл раствора СК-6, перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
2. Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки одного ряда 96-луночного планшета (возможно нанесение в любой ряд планшета) или в стрипованные пробирки. При необходимости удалить пузыри со дна лунок (пробирок) кратким центрифугированием.
3. Установить 96-луночный планшет или стрипованные пробирки в прибор для капиллярного электрофореза.

4.1.2. Запуск спектральной калибровки СК-6

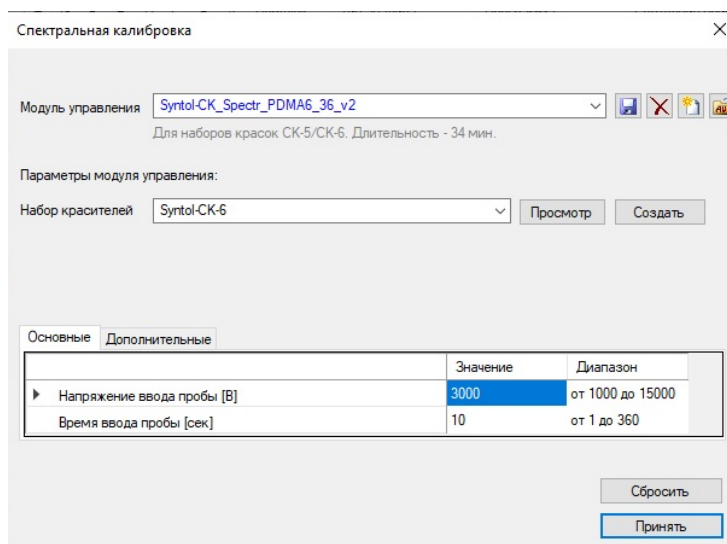
1. Открыть управляющую программу Нанофор 05.
2. Открыть раздел меню «Сервис», выбрать в нём «Спектральная калибровка».



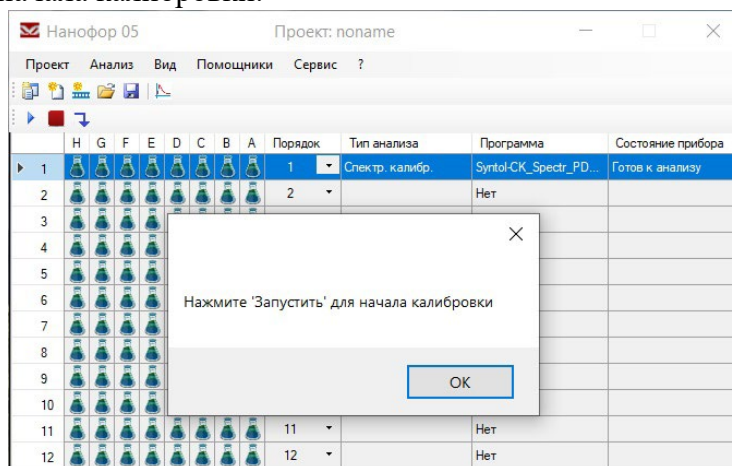
3. Выбрать ряд плашки, в котором находится спектральный калибратор, нажать «Далее».



4. В качестве модуля управления выбрать «Syntol-CK_Spectr...», подходящий к сочетанию капиллярной сборки и типа полимера. В качестве набора красителей выбрать «Syntol-CK-6».



5. Кликнуть по кнопке «Принять». В основном окне рабочей программы нажать «Запустить» для начала калибровки.



4.1. Подготовка продуктов амплификации

1. Приготовить смесь HiDi-формамида и размерного стандарта СД-520 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
HiDi-формамид	10
Стандарт длины СД-520	1

ПРИМЕЧАНИЕ! При расчете объемов компонентов смеси, необходимых на весь анализ, следует учесть, что как минимум одна лунка плашки/стрипа при анализе каждой серии образцов должна содержать аллельную лестницу.

2. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить **10 мкл** смеси в каждую лунку плашки/стрипа.
4. Внести в смесь 1 мкл ПЦР-продукта.
5. В отдельную лунку внести **1 мкл** раствора **аллельной лестницы**.
6. Закрывать плашку/стрип.
7. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
8. Денатурировать образцы в амплификаторе 1 мин при 95°C, охладить до 4 °C.

ВАЖНО!!! Нанесение образцов происходит из восьми лунок ряда одновременно. Не допускается запуск прибора, если в анализируемом ряду имеется хотя бы одна незаполненная лунка! В пустые лунки, не содержащие образцы, следует внести 10 мкл формамида.

9. Собрать плашку и установить ее в генетический анализатор в соответствии с руководством пользователя.

4.2. Запуск фрагментного анализа

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе проводится в соответствии с руководством пользователя, предоставляемым производителем. Рекомендуемые параметры электрофореза представлены ниже:

Длина капилляров	36 см	36 см
Вид полимера	ПДМА-4	ПДМА-6
Параметры		
Напряжение ввода пробы [В]	1800	1800
Время ввода пробы [сек]	20	20
Напряжение электрофореза [В]	15000	15000
Время электрофореза [сек]	1700	2100
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	100	100

ПРИМЕЧАНИЕ! Время электрофореза и время исключения регистрации электрофореза, зависит от типа полимера и длины капилляров, и настраивается пользователем в зависимости от используемой комбинации капилляров и полимера.

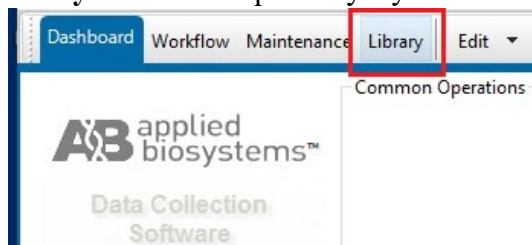
5. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА АВ3500/АВ3500XL

5.1. Проведение спектральной калибровки

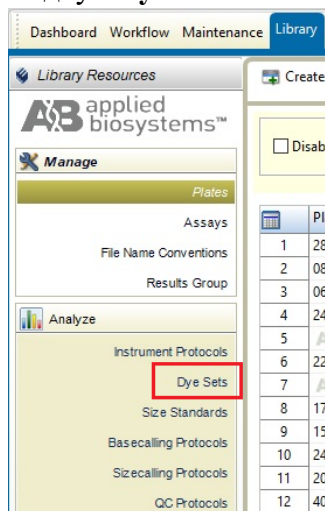
Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 6-ти цветным калибратором СК-6.

5.1.1. Создание DyeSets

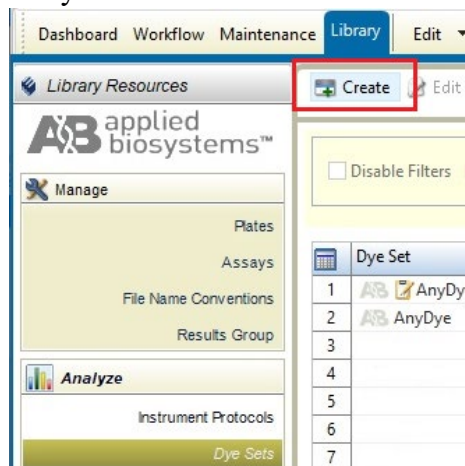
1. Открыть программу **Data Collection Software**
2. Кликнуть по иконке «**Library**» в левом верхнем углу окна.



3. В разделе «**Analyze**» выбрать вкладку «**DyeSets**».



4. В верхней части нажать кнопку «**Create**»



5. В открывшемся окне в поле «**Dye Set Name**» написать **СК-6**, в поле «**Chemistry**» из выпадающего списка выбрать «**Matrix Standard**», а в поле «**Dye Set Template**» из выпадающего списка выбрать «**AnyDye Template**»

Create New Dye Set

Setup a Dye Set

⚠ Dye Set Name is a required field. Provide a unique value.

* Dye Set Name ☐ Locked

* Chemistry

* Dye Set Template

Arrange Dyes

Dye Selection

Reduced Selection

Calibration Peak Order

Parameters

Notes

6. В таблице «**Arrange Dyes**» установить последовательность пиков, на вкладке «**Parameters**» установить диапазон пиков и время электрофореза.

Edit Dye Set CK-6

Setup a Dye Set

* Dye Set Name CK-6 ☐ Locked

* Chemistry Matrix Standard

* Dye Set Template AnyDye Template

Arrange Dyes

	6	5	4	3	2	1
Dye Selection	☒	☒	☒	☒	☒	☒
Reduced Selection	☒	☒	☒	☒	☒	☒
Calibration Peak Order	6	5	4	3	2	1

Parameters

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

Matrix Condition Number Upper Limit

Locate Start Point * After Scan * Before Scan

* Limit Scans To

Sensitivity

* Minimum Quality Score

Notes

Applied Biosystems

7. Нажать кнопку «**Save**», для сохранения **Dye Set CK-6**.

5.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

1. В отдельной пробирке смешать **Ди-формамид** и раствор **СК-6** по протоколу:

	AB3500	AB3500XL
Ди-формамид	80 мкл	240 мкл
СК-6	8 мкл	24 мкл

2. Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.

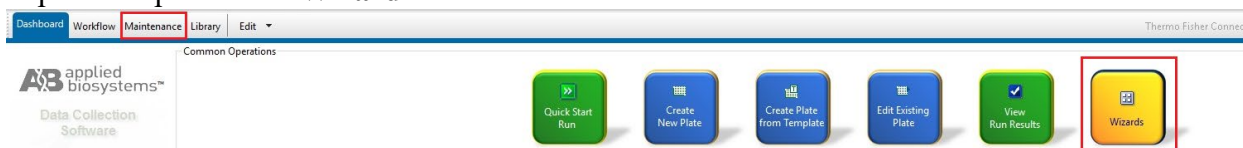
3. Добавить **10 мкл** рабочего раствора в лунки:

ПРИМЕЧАНИЕ! В случае 24-х капиллярного генетического анализатора – внести раствор в три ряда 96-луночного планшета (возможно внесение в 1-3, 4-6, 7-9, 10-12 ряды планшета) или в стрипованные пробирки.
В случае 8-ми капиллярного генетического анализатора - внести раствор в ряд 96-луночного планшета или в стрипованные пробирки

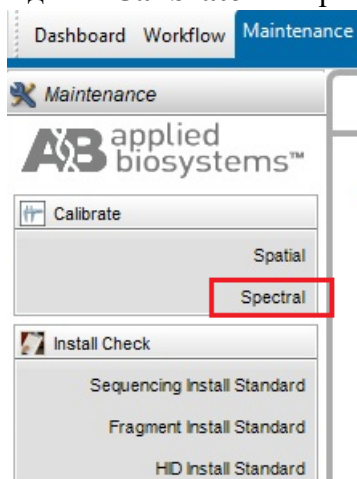
4. Установить 96-ти луночный планшет или стрипованные пробирки, с раствором калибратора **СК-6**, в прибор для капиллярного электрофореза.

5.1.3. Запуск спектральной калибровки

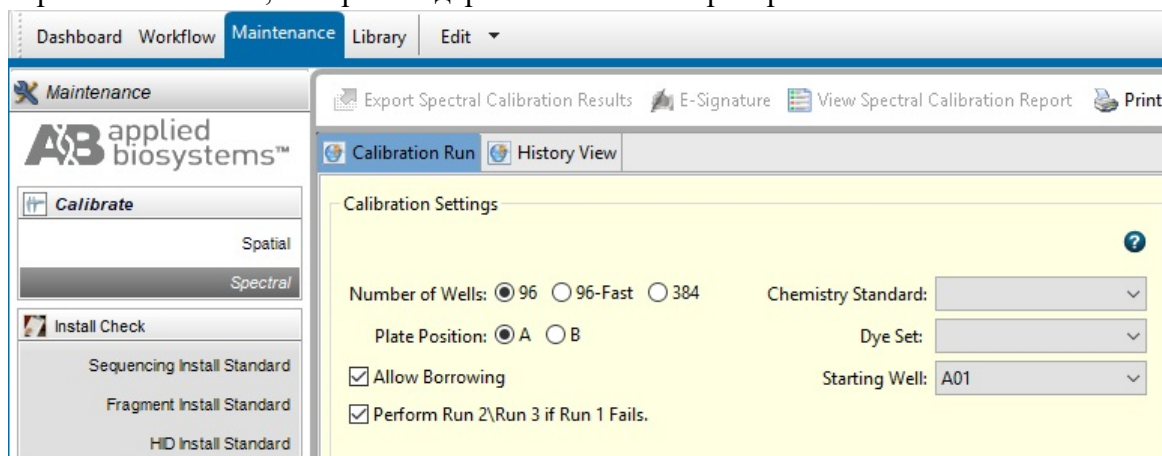
6. Открыть программу **Data Collection Software**. Кликнуть по клавише «**Maintenance**» в верхней строке или «**Wizard**».



7. В открывшейся вкладке слева в разделе «**Calibrate**» выбрать «**Spectral**».



8. В открывшемся окне «**Calibration Run**», указать «**Number of Wells**» - количество лунок в используемом планшете, «**Plate Position**» - позицию планшета в приборе, в поле «**Chemistry Standard**» из выпадающего списка выбрать **Matrix Standard**, в поле «**Dye Set**» из выпадающего списка выбрать **СК-6**, а в поле «**Starting Well**» указать номер первого стрипа в планшете, который содержит смесь калибратора.



9. Нажать на кнопку «**Start Run**» для запуска спектральной калибровки.

10. После завершения калибровки нажать кнопку «**Accept**» в нижней части окна.

5.2. Подготовка продуктов амплификации

1. Приготовить смесь HiDi-формамида и размерного стандарта **СД-520** в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
HiDi-формамид	10
Стандарт длины СД-520	1

ПРИМЕЧАНИЕ! При расчете объемов компонентов смеси, необходимых на весь анализ, следует учесть, что как минимум одна лунка плашки/стрипа при анализе каждой серии образцов должна содержать аллельную лестницу.

2. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить **10 мкл** смеси в каждую лунку плашки/стрипа.
4. Внести в смесь по 1 мкл ПЦР-продукта.
5. В отдельную лунку внести **1 мкл** раствора **аллельной лестницы**.
6. Закрывать плашку/стрип.
7. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
8. Денатурировать образцы в амплификаторе 1 мин при 95°C, охладить раствор до 4 °C.

ВАЖНО!!! Нанесение образцов происходит из восьми (AB3500) или двадцати четырех (AB3500 XL) лунок ряда одновременно. Не допускается запуск прибора, если в анализируемом ряду имеется хотя бы одна незаполненная лунка! В пустые лунки, не содержащие образцы, следует внести по 10 мкл воды или формамида.

9. Собрать плашку и загрузить в генетический анализатор в соответствии с руководством пользователя.

5.3. Запуск фрагментного анализа

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе проводится в соответствии с руководством пользователя, предоставляемым производителем.

Рекомендуемые параметры электрофореза для комбинации капилляров 36 см и полимера POP4:

Параметры	Рекомендуемое значение
Injection Voltage [kVolts]	1.2
Injection Time [sec.]	20
Run Voltage [kVolts]	15
Data Delay [sec]	1
Run Time [sec]	1800

ПРИМЕЧАНИЕ! Время электрофореза - «**Run Time**» и время исключения регистрации электрофореза - «**Data Delay**», зависит от типа полимера и длины капилляров, и настраивается пользователем в зависимости от используемой комбинации капилляров и полимера, а также валидации в конкретной лаборатории.

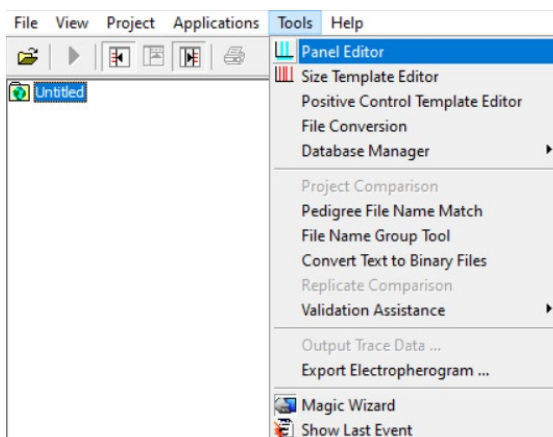
6. АНАЛИЗ ДАННЫХ

6.1. Анализ данных в программе GeneMarker

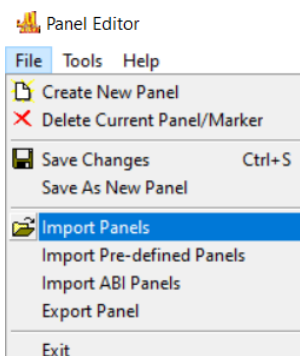
6.1.1. Импорт файлов для анализа данных

При первом анализе данных необходимо импортировать файл панели, содержащий информацию о бинах и файл размерного стандарта. Файлы предоставляются производителем набора. Для этого:

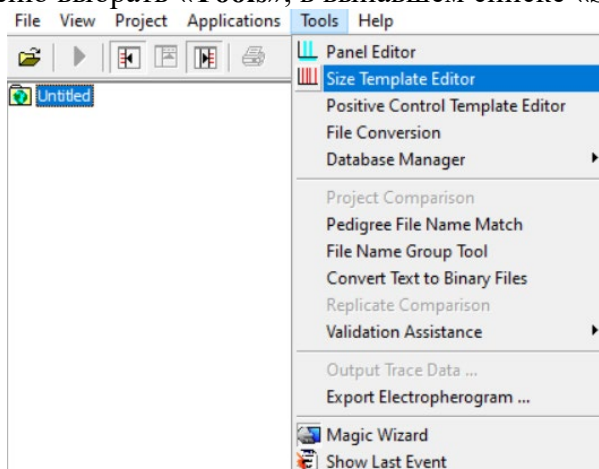
1. Запустить программу «GeneMarker». В верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor»



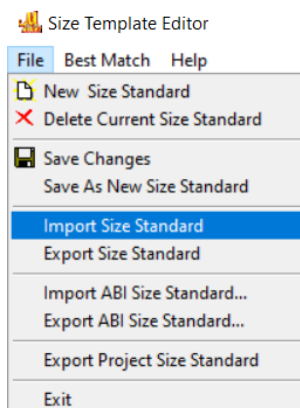
2. В открывшемся окне выбрать «File» в выпавшем списке «Import Panels»



3. Выбрать папку с файлом панели (Gr_Human) и подгрузить его в программу «GeneMarker»
4. Закрыть окно «Panel Editor»
5. Затем в верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Size Template Editor»



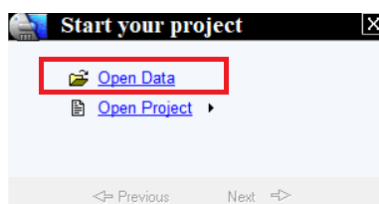
6. В открывшемся окне выбрать «File» в выпавшем списке «Import Size Standard»



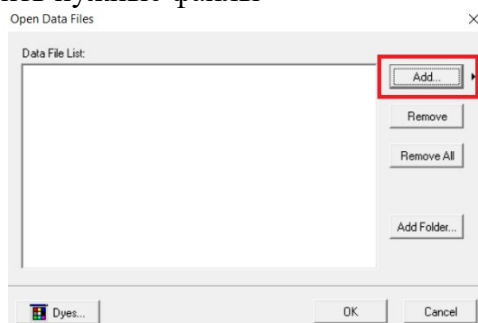
7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (CD-520) и подгрузить его в программу «GeneMarker»
8. Закрывать окно «Size Template Editor»

6.1.2. Создание проекта анализа данных

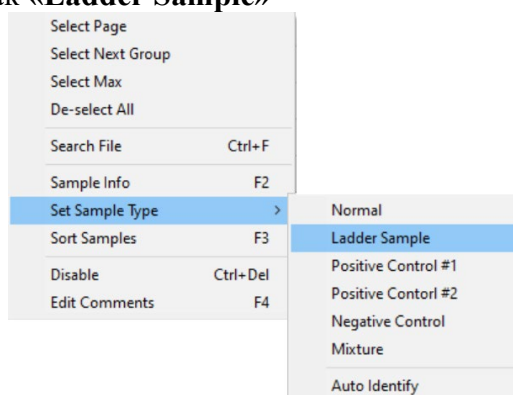
1. Запустить программу «GeneMarker». Кликнуть по «Open Data» в окне «Start your project»



2. Нажать «Add» и загрузить нужные файлы



3. После добавления файлов нажать «OK».
4. Выбрать файл аллельной лестницы в списке слева, кликнуть правой клавишей мыши и установить тип образца как «Ladder Sample»



5. Выбрать файл положительного контрольного образца в списке слева, кликнуть правой клавишей мыши и установить тип образца как «Positive Control#1»

- Выбрать файл отрицательного контрольного образца в списке слева, кликнуть правой клавишей мыши и установить тип образца как «**Negative Control**»
- Запустить анализ нажав на клавишу «**Run Project**» в верхнем меню



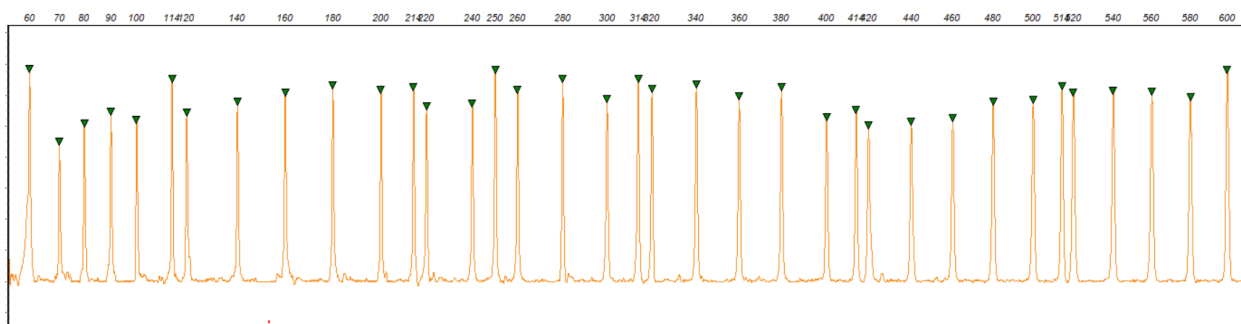
- В открывшемся окне «**Run Wizard**» в графе «**Panel**» выбрать панель «**Gp_Human+**», в графе «**Size Standard**» выбрать размерный стандарт «**CD-520**» и нажать «**Next**»
- В следующем окне в графе «**Min Intensity**» (минимальная высота пиков между локусами) установить значение, отсекающее артефактные пики между локусами (например 500) и нажать «**Next**»
- Параметры в следующем окне оставить без изменения и нажать «**OK**»

6.1.3. Анализ размерного стандарта

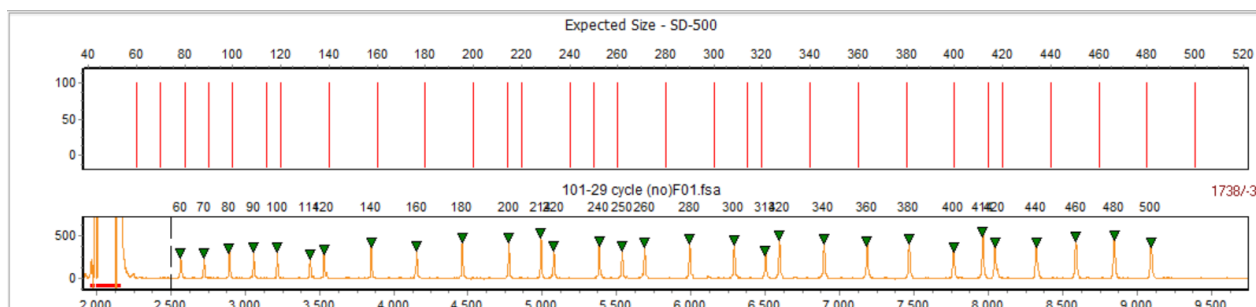
- Необходимо убедиться, что во всех образцах правильно подписан размерный стандарт. Для этого, в верхней панели нужно нажать на кнопку «**Size Calibration**».



- В открывшемся окне «**Calibration Charts**» проверить все образцы по списку и убедиться, что оценка качества размерного стандарта не ниже 96 баллов из 100. Если это верно для всех образцов, то дальнейшие действия не требуются, окно можно закрыть.



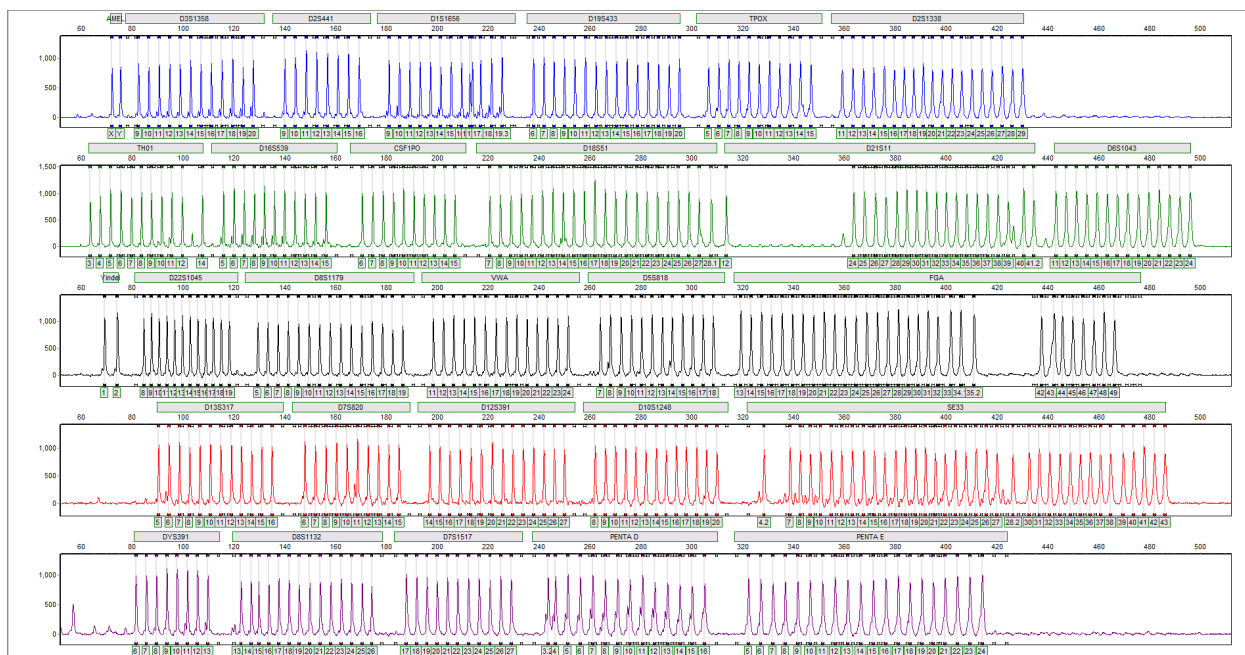
- Если для каких-то образцов оценка качества размерного стандарта ниже 96 баллов, его нужно проверить, и, возможно, переподписать. Для этого, в списке образцов выбрать нужный образец нажатием левой кнопки мыши.
- Верхний график – это виртуальный размерный стандарт, построенный программой для проверки, на него нужно ориентироваться визуально. График ниже – размерный стандарт выбранного образца. Нужно убедиться, что паттерн подписанных пиков нижнего графика совпадает с паттерном пиков верхнего графика. Подписанные пики имеют зелёные треугольники на вершинах.



- Если на каких-то пиках треугольников не хватает, нужно их проставить, нажав правой кнопкой мыши на нужный пик и выбрав в выпавшем меню «Add Peak». Для удобства график можно масштабировать.
- Лишние пики можно удалить, нажав на них правой кнопкой мыши и выбрав «Delete Peak».
- По окончании корректировки пиков стандарта выбранного образца, нужно правой кнопкой мыши нажать на свободное поле между пиками и в выпадающем меню выбрать «Update Calibration». Повторить процедуру для всех образцов, качество размерного стандарта которых ниже 96 баллов. Закрыть окно «Calibration Charts» и приступить к анализу Аллельной лестницы.

6.1.3. Анализ аллельной лестницы

- Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с Аллельной лестницей.



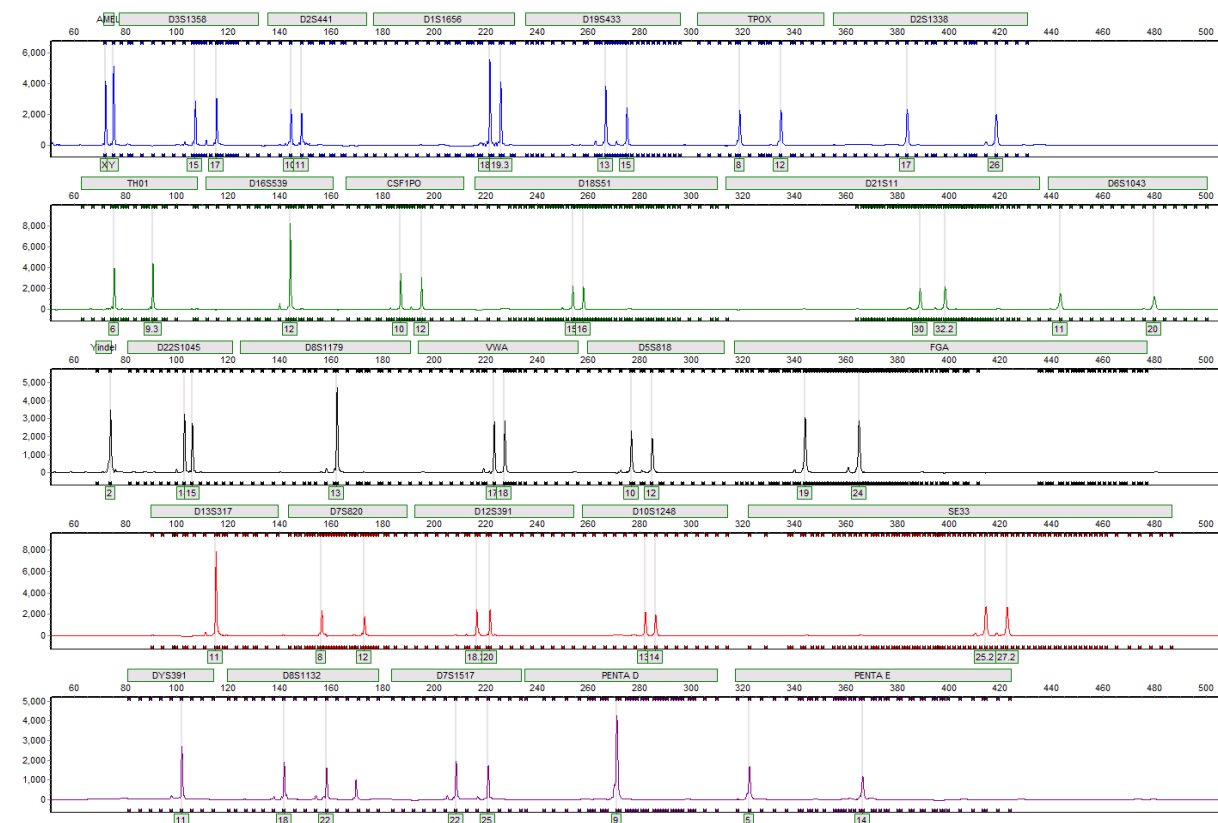
- В верхнем меню выбрать канал «Blue» используя клавишу «Show Dye»
- Убедиться, что всем пикам Аллельной лестницы по каналу «Blue» присвоено верное значение аллеля.
- В верхнем меню выбрать канал «Green» используя клавишу «Show Dye»
- Убедиться, что всем пикам Аллельной лестницы по каналу «Green» присвоено верное значение аллеля.
- В верхнем меню выбрать канал «Yellow» используя клавишу «Show Dye»
- Убедиться, что всем пикам Аллельной лестницы по каналу «Yellow» присвоено верное значение аллеля.
- В верхнем меню выбрать канал «Red» используя клавишу «Show Dye»
- Убедиться, что всем пикам Аллельной лестницы по каналу «Red» присвоено верное значение аллеля
- В верхнем меню выбрать канал «Purple» используя клавишу «Show Dye»
- Убедиться, что всем пикам Аллельной лестницы по каналу «Purple» присвоено верное значение аллеля (см. Таблицу 3)

Таблица 3. Аллели входящие в состав аллельной лестницы

Краситель	Локус	Диапазон аллелей	Аллели
FAM	Amelogenin	X	X
		Y	Y
	D3S1358	8-21	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
	D2S441	8-17	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	D1S1656	8-21	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3
	D19S433	5.2-20	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
	TPOX	4-16	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
	D2S1338	10-29	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
R6G	TH01	3-14	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14
	D16S539	4-16	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
	CSF1PO	5-16	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
	D18S51	6-28.3	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28.1
	D21S11	12-41.2	12, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40.2, 41.2
	D6S1043	11-24	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
TAMRA	Yindel	1-2	1, 2
	D22S1045	7-20	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
	D8S1179	4-20	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
	VWA	10-25	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
	D5S818	6-19	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
	FGA	12.2-51.2	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33.1, 34.1, 35.2, 42, 43.1, 44, 45, 46, 47, 48, 49
ROX	D13S317	5-17	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	D7S820	5-16	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
	D12S391	13-28	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
	D10S1248	7-21	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
	SE33	3-43	4.2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28.2, 30, 31, 32, 33, 34, 32, 36, 37, 38, 39
Sy630	DYS391	6-14	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
	D8S1132	12.1-27	13.1, 14.1, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26
	D7S1517	16-28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
	Penta D	2.2-17	3.2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	Penta E	5-25	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24

6.1.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с ПКО.
2. В верхнем меню, используя клавишу «Show Dye», поочередно выбрать канал «Blue», «Green», «Yellow», «Red», «Purple» убедиться, что всем пикам ПКО присвоено верное значение аллельного состояния. (см. Таблицу 1).



6.1.5. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с ОКО.
2. Убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

6.1.6. Анализ образца

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу образца.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал используя клавишу «Show Dye»
3. Убедиться, что всем пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля.

6.2. Анализ данных в Gene Mapper

6.2.1. Импорт файлов для анализа данных

При первом анализе данных необходимо импортировать файл панели, бинов, а также файл размерного стандарта. Файлы предоставляются производителем набора. Для этого:

1. Запустить программу «GeneMapper» в верхнем меню нажать «Tools» в выпавшем списке выбрать «Panel Manager».
2. В открывшемся окне слева нажать «Panel Manager».
3. В верхнем меню нажать «File» в выпавшем списке выбрать пункт «Import Panels».
4. Выбрать папку с файлом панели (GrHuman) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «Import».
5. Щелкнуть по папке GrHuman появившейся в списке «Panel Manager»

6. В верхнем меню нажать «**File**» в открывшемся списке выбрать пункт «**Import Bin Set**».
7. Выбрать папку с файлом бинов (GpHuman_bins) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**Panel Editor**».
8. В верхнем меню нажать «**Tools**» в открывшемся списке выбрать «**GeneMapper Manager**».
9. В верхней строке открывшегося окна перейти на вкладку «**Size Standards**» и нажать кнопку «**Import**».
10. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (CD-520) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».
11. Перейти на вкладку «**Analysis Method**» и нажать кнопку «**Import**».
12. Выбрать папку с файлом метода (GpHuman_method) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**GeneMapper Manager**».

6.2.2. Анализ данных

1. В программе «**GeneMapper**» в верхнем меню выбрать «**File**», в открывшемся списке выбрать «**Add Samples to Project**»
2. В открывшемся окне выбирать папку с файлами для анализа и нажать кнопку «**Add to list**» внизу под списком папок.
3. Выбранная папка появиться в окне справа, внизу нажать кнопку «**Add**».
4. Для образцов выбрать ранее импортированные в программу: «**Panel**» – GpHuman, «**Size Standard**» - CD-520, «**Analysis Method**» - GpHuman+_method.
5. Запустить анализ.

6.2.3. Анализ размерного стандарта

1. Необходимо убедиться, что во всех образцах правильно подписан размерный стандарт. Для этого, нужно проверить значения SQ для всех образцов в проекте. Если SQ – зелёный квадрат, то размерный стандарт этого образца подписан верно. Если SQ – жёлтый треугольник, или красный круг, то стандарт необходимо проверить.

Well	SE	SQO	ARNM	SFNF	IMNF	SNF	SOS	SQ
A07				■	■	■	▲	●
B07				■	■	■	▲	●
C07				■	■	■	▲	●
D07				■	■	■	▲	●

2. Для этого, нужно выделить все проверяемые образцы и в верхней панели нажать на кнопку «**Size Match Editor**».
3. В открывшемся окне из списка слева нужно поочерёдно выбирать образцы для проверки нажатием левой кнопки мыши. На графике справа будут отображаться их размерные стандарты.
4. Неправильно подписанный пик можно удалить или переименовать, нажав на него правой кнопкой мыши. Неподписанный пик так же можно подписать.
5. По окончании редактирования размерного стандарта, нужно нажать кнопку внизу «**Apply**», затем, «**OK**». После проверки и исправления всех образцов, окно «**Size Match Editor**» можно закрыть. Далее, можно приступить к анализу Аллельной лестницы.

6.2.4. Анализ аллельной лестницы

1. Открыть файл Аллельной лестницы.
2. Удостоверится, что все аллели входящие в состав аллельной лестницы расположены в диапазонах бинов панели «GpHuman» и им присвоено верное значение аллеля (см. Таблицу 3).

6.2.5. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

1. Открыть образец ПКО
2. В верхнем меню поочередно включать синий, зеленый, желтый, красный каналы убедиться в том, что всем пикам ПКО присвоено верное значение аллельного состояния. (см. таблицу 1)
3. Если присвоенное значение аллеля не соответствует значению в таблице необходимо настроить панель.
4. Для настройки панели необходимо закрыть окно с образцом. В верхнем меню выбрать «**Tools**» в открывшемся списке выбрать «**Panel Manager**».
5. В открывшемся окне выбрать папку **GpHuman+**. В ней открыть папку **GpHuman+**, в результате отобразится список всех локусов.
6. В верхнем меню нажать кнопку «**Add Reference Data**».
7. В открывшемся окне внизу слева выбрать папку с данными постановки, выбрать образец ПКО. Нажать «**Add To List**».
8. Справа появятся выбранные папка и файл. Внизу справа нажать кнопку «**Add**».
9. В предыдущем окне слева появятся выбранные референсные образцы. Выбирать из списка локус, который необходимо редактировать, внизу выбрать образец ПКО.
10. В открывшемся окне отключить все каналы, кроме редактируемого. Внизу нажать на горизонтальную линию диапазона локуса, для отображения границ локуса. Расширить границы локуса и сдвинуть бины локуса, при этом диапазон промежутков между аллелями должен быть сохранен.
11. Проверить, что всем пикам ПКО были присвоены верные значения.
12. После настройки значений локуса нажать кнопку «**Apply**».
13. Повторить действия со всеми локусами, которым были неверно присвоены аллельные состояния.
14. Нажать кнопку «**OK**».

6.2.6. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

1. Открыть образец ОКО.
2. Убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

6.2.7. Анализ образца

1. Открыть образец.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал.
3. Убедиться, что всем пикам анализируемого образца по данному каналу присвоено значение аллеля.
4. Повторить действие со всеми каналами.

7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аллельный статус исследуемого образца оценивается по каждому локусу отдельно. Возможно два варианта, гомозиготный – один пик в локусе, и гетерозиготный – два пика в локусе.

Рекламации на набор реактивов направлять по адресу: 127434 г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
тел. (495) 977-74-55, syntol@syntol.ru