

**Набор реагентов для проведения генотипирования крупного
рогатого скота по 21 микросателлитному локусу и локусу
амелогенина «Gene Profile Cattle 2.0»**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



СОДЕРЖАНИЕ

1.	ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	4
1.1.	Описание набора	4
1.2.	Область применения набора	5
2.	ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	6
2.1.	Состав набора	6
2.2.	Количество анализируемых проб	6
3.	УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА	6
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	6
5.	ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА	7
6.	ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	8
6.1.	Подготовка к проведению реакции амплификации.....	8
6.2.	Подготовка к проведению реакции амплификации из цельной крови	8
6.3.	Подготовка к проведению реакции амплификации из крови на ФТА карте	9
6.4.	Подготовка к проведению реакции амплификации из ушного выщипа	10
6.5.	Проведение амплификации.....	10
7.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА НАНОФОР05	11
7.1.	Проведение спектральной калибровки	11
7.1.1.	Создание набора красителей	11
7.1.2.	Подготовка раствора спектрального калибратора	11
7.1.3.	Запуск спектральной калибровки	12
7.2.	Подготовка продуктов амплификации.....	13
7.3.	Запуск фрагментного анализа	13
8.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (AB3500/ AB3500XL).....	15
8.1	Проведение спектральной калибровки.....	15
8.1.1.	Создание DyeSets.....	15
8.1.2	Подготовка раствора спектрального калибратора	17
8.1.3	Запуск спектральной калибровки	17
8.2	Подготовка и загрузка продуктов амплификации.....	18
8.3	Запуск фрагментного анализа	19
9.	АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	20
9.1.	Анализ данных в программах GeneMarker и GeneMarker HID.....	20
9.1.1.	Импорт файлов для анализа данных	20
9.1.2.	Создание проекта анализа данных	21
9.1.3.	Анализ размерного стандарта	24

9.1.4.	Анализ положительного контрольного образца (ПКО).....	25
9.1.5.	Внесение профиля ПКО в шаблон анализа.	29
9.1.6.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО).....	33
9.1.7.	Анализ образцов	33
9.1.8.	Исключение из анализа статтеров и артефактных пиков	33
9.2.	Анализ данных в Gene Mapper	34
9.2.1.	Импорт файлов для анализа данных	34
9.2.2.	Анализ данных	37
9.2.3.	Анализ размерного стандарта	38
9.2.4.	Анализ положительного контрольного образца (ПКО).....	39
9.2.5.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	43
9.2.6.	Анализ образца.....	43
10.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	44
11.	ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	47
12.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	47
13.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	48

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание набора

Набор реагентов «Gene Profile Cattle 2.0» предназначен для генетической идентификации и определения родства крупного рогатого скота (*Bos taurus*).

В основе работы набора лежит мультиплексная амплификация 21-го STR-локуса и локуса амелогенина с последующим анализом длин ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза.

Все представленные в наборе STR-локусы являются динуклеотидными. Из них двенадцать рекомендованы Международным Обществом Генетики Животных (International Society of Animal Genetics - ISAG): BM1818, BM1824, BM2113, ETH3, ETH10, ETH225, INRA023, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227. Восемь локусов рекомендованы Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO) для генетических исследований домашних животных: CSSM66, CSRM60, ILSTS006, RM067, MGTG4B, SPS113, ILSTS005, INRA063. Также, дополнительно включен высокополиморфный локус HAUT27 и локус, определяющий половую принадлежность, AMEL.

Используемые в наборе праймеры мечены красителями, детектируемыми в каналах Blue, Green, Yellow, Red, Purple. Стандарт длин СД-340 детектируется в канале Orange. Использование шести красителей позволяет одновременно детектировать 22 ампликона и стандарт длин в одном капилляре.

Таблица 1. Характеристика локусов набора «GeneProfile Cattle 2.0»

Канал детекции	Локус	Хромосома	Структура повтора	Диапазон аллелей п.н.
Blue	TGLA227	18	(TG) _n	75-103
	BM2113	2	(CA) _n	121-143
	TGLA53	16	(TG) ₆ CG(TG) ₄ (TA) _n	154-190
	ETH10	5	(AC) _n	209-225
Green	CSRM60	10	(AC) _n	88-114
	SPS115	15	(CA) _n TA(CA) ₆	248-262
	TGLA122	21	(AC) _n (AT) _n	137-183
	BM1818	23	(TG) _n	256-280
Yellow	AMEL	Y/X		Y/X
	HAUT27	26	(AC) _n	140-158
	CSSM66	14	(AC) _n	179-205
	BM1824	1	(GT) _n	178-190
	ETH3	19	(AC) _n	103-131
Red	TGLA126	20	(TG) _n	109-125
	ETH225	9	(TG) ₄ CG(TG)(CA) _n	140-158
	INRA023	3	(AC) _n	198-222
	ILSTS006	7	(GT) _n	284-302
	ILSTS005	10	(AT) ₆ (GT) _n AT(GT) ₂ (AT) ₈	176-194
Purple	RM067	4	(CA) _n	88-108
	MGTG4B	4	(CA) _n	129-153
	SPS113	10	(CA) _n	135-159
	INRA063	18	(AC) _n	167-189

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 22 локусов в одной пробирке. Разделение ампликонов, полученных в результате ПЦР, проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов (например Нанофор 05).

Для получения полного (по всем 22 локусам) генотипа исследуемого образца достаточно 1 нанограмм (нг) не деградированной ДНК. Оптимальное количество ДНК в реакцию — 10 нг. Диапазон концентраций ДНК для проведения амплификации от 1 до 20 нг в реакцию.

Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК составляет 5 мкл. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Возможно проведение прямой ПЦР:

- 1) С внесением 0,5 мкл цельной крови в приготовленную реакционную смесь.
- 2) С внесением 5 мкл растворенной в деионизованной H₂O крови (2 мкл крови + 200 мкл H₂O) в приготовленную реакционную смесь.
- 3) С внесением панча FTA карты с кровью диаметром 1-1,2 мм в приготовленную реакционную смесь.
- 4) С внесением 2 мкл раствора, полученного при обработке ушного выщипа (время обработки 15 мин) с помощью реагента «ГенПреп» (Синтол, кат. № HG-504/ HG- 504p).

1.2. Область применения набора

Набор может быть использован в лабораториях племенных хозяйств для генотипирования животных и установления родства.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми

2.1. Состав набора

Таблица 1 – Состав набора «Gene Profile Cattle 2.0»

№	Компонент	Описание	Номинальный объем, мкл	Количество, шт.
1.	РС	Реакционная смесь	1500	1 пробирка
2.	СП	Смесь специфических праймеров	500	1 пробирка
3.	ПКО	Положительный контрольный образец – стабилизированный раствор ДНК быка	50	1 пробирка
4.	СД 340	Стандарт длин – набор фрагментов известной длины (60, 80, 100, 140, 180, 220, 240, 260, 300, 320, 340)	100	1 пробирка
5.	H ₂ O	Деионизованная H ₂ O	1700	1 пробирка

2.2. Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение 100 реакций, включая контрольные образцы.

3. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА

Хранение: в темноте, при температуре от -24 °С до -16 °С.

Транспортирование: при температуре от -24 °С до -16 °С. (Допускается транспортирование до -8 °С в течение 7 дней)

Эксплуатация: Набор должен применяться в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Набор предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. п. 2.2). Набор реагентов готов к применению согласно инструкции.

Срок годности набора: 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения. Срок годности реагентов до и после вскрытия соответствует сроку годности набора.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работа с набором должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований МУ 1.3.2569-09, СанПиН 3.3686-21, СанПиН 2.1.3684-21.

К работе с набором допускается только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению исследования материала методом ПЦР с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор реагентов строго по назначению;

- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как потенциально инфекционно-опасные;
- Удалять и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21;
- Соблюдать правила последовательной обработки материала и поточность продвижения исследуемого материала. Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое;
- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром;
- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию в паспорте качества;
- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами;
- Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека: канцерогенный эффект, мутагенное действие, репродуктивная токсичность отсутствуют.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности изделие является безопасным.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- ПЦР-бокс;
- Штатив для микропробирок 1,5 мл (“PM-96x1,5 /2,0“, кат. № СТ-17);
- Пробирки 1,5 или 2,0 мл;
- Штатив для 96-ти луночных ПЦР планшет или стрипов. (“ПЦР-96“, кат. № СТ-12);
- Дозатор переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл;
- Наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл;
- 96-ти луночные ПЦР планшеты или микропробирки в стрипах для ПЦР;
- Пленка для 96-ти луночных ПЦР планшет или крышки к микропробиркам в стрипах;
- Центрифуга-вортекс для пробирок объемом 1,5 или 2 мл (Циклотемп-901);
- Центрифуга для 96-ти луночных ПЦР планшет;
- Прибор для проведения ПЦР:
- Спектральный калибратор «Spectrum 6A» (HG-705);
- Полимер для проведения капиллярного электрофореза (ПДМА-4, ПДМА-6);
- Буфер для проведения капиллярного электрофореза (ТАПС);

- Деионизованный формамид;
- Автоматический генетический анализатор (Нанофор 05);
- Емкость для сброса использованных материалов.

6. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

6.1. 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	мкл на реакцию
РС	15
СП	5
ДНК	1-5
H ₂ O	до 25

ВАЖНО! С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контрольный образец (ПКО) и один отрицательный контрольный образец (ОКО).

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

1. Разморозить пробирки с РС и СП, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем РС и СП (согласно таблице), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по **20 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси.
4. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в пробирки (на стенку) от **1** до **5 мкл** исследуемого образца, при необходимости, общий объем довести до **25 мкл** деионизованной H₂O.
5. В одну из пробирок (планшеты, стрипы) с приготовленной рабочей реакционной смесью внести **5 мкл** деионизованной H₂O (отрицательный контрольный образец), в еще одну **5 мкл** ПКО (положительный контрольный образец).
6. Закрывать ПЦР пробирки.
7. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

6.2. Подготовка к проведению реакции амплификации из цельной крови

Набор реагентов Gene Profile Cattle 2.0 позволяет провести реакцию амплификации из цельной крови напрямую минуя стадию выделения ДНК.

Первый способ:

1. Разморозить пробирки с РС и СП, перемешать на вортексе и центрифугировать для

сброса капель.

2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем **РС** и **СП** (согласно таблице 2), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по **20 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси.
4. Внести в пробирку **5 мкл** деионизованной H_2O .
5. Добавить **0,5 мкл** цельной крови. В одну из пробирок ПЦР (планшеты, стрипы) внести **20 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси и **5 мкл** деионизованной H_2O (отрицательный контрольный образец), в еще одну внести **20 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси и **5 мкл** **ПКО** (положительный контрольный образец).
6. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

Второй способ:

1. Внести в пробирку для ПЦР **200 мкл** деионизованной H_2O .
2. Добавить **2 мкл** цельной крови.
3. Перемешать содержимое на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
4. Разморозить пробирки с **РС** и **СП**, перемешать на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
5. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем **РС** и **СП** (согласно таблице 2), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
6. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по **20 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси.
7. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести 5 мкл раствора крови в деионизованной H_2O .
8. В одну из пробирок (планшеты, стрипы) с приготовленной рабочей реакционной смесью внести **5 мкл** деионизованной H_2O (отрицательный контрольный образец), в еще одну **5 мкл** **ПКО** (положительный контрольный образец).
9. Закрыть ПЦР пробирки.
10. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

ПРИМЕЧАНИЕ – При использовании второго способа значительно снижается вероятность внесения избыточного количества крови в реакцию и повышается качество амплификации.

6.3. Подготовка к проведению реакции амплификации из крови на FTA карте

1. Разморозить пробирки с **РС** и **СП**, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
2. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем **РС** и **СП** (согласно таблице 2), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по **20 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси.
4. Внести в пробирку **5 мкл** деионизованной H_2O .
5. Внести в пробирку для ПЦР панч FTA карты диаметром 1-1,2 мм.
6. Общий объем довести до **25 мкл** деионизованной H_2O .

7. В одну из пробирок (планшеты, стрипы) с приготовленной рабочей реакционной смесью внести **5 мкл** деионизированной H₂O (отрицательный контрольный образец), в еще одну **5 мкл** ПКО (положительный контрольный образец).
8. Закрывать ПЦР пробирки.
9. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

6.4. Подготовка к проведению реакции амплификации из ушного выщипа

1. В **2 мл** пробирку поместить **5-10 мг** навески ткани ушного выщипа.
2. Добавить **300 мкл** реагента «ГенПреп» (кат. № HG-504/ HG-504p) и провести обработку согласно инструкции.
3. Разморозить пробирки с РС и СП, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
4. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем РС и СП (согласно таблице в п.п. 3.1), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
5. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по **20 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси.
6. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести от **1 до 3 мкл** раствора, полученного при обработке ушного выщипа.
7. Общий объем довести до **25 мкл** деионизированной H₂O.
8. В одну из пробирок (планшеты, стрипы) с приготовленной рабочей реакционной смесью внести **5 мкл** деионизированной H₂O (отрицательный контрольный образец), в еще одну **5 мкл** ПКО (положительный контрольный образец).
9. Закрывать ПЦР пробирки.
10. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

ВАЖНО! При обработке реагентом «ГенПреп» препарат ДНК не очищается от продуктов лизиса клеток. Что может привести к ингибированию амплификации. Поэтому, оптимальный объем раствора для внесения в ПЦР должен быть установлен в каждой лаборатории самостоятельно.

6.5. Проведение амплификации

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

Температура	Время	ДНК, кровь	Кровь на ФТА карте
95 ⁰ C	2 мин		
95 ⁰ C	5 с	30 циклов	32 цикла
60 ⁰ C	1 мин 20 с		
60 ⁰ C	20 мин		

ПЦР-продукты можно хранить неделю в защищенном от света месте при 2...8⁰C. В случае длительного хранения при -20⁰C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА НАНОФОР05

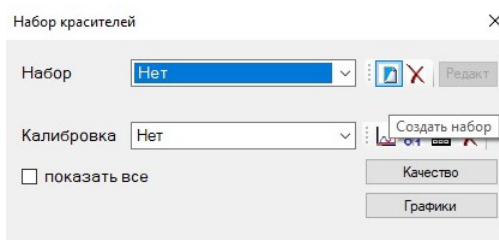
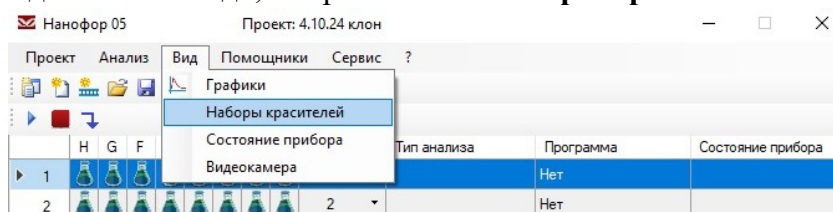
Для получения полного STR-профиля проводится фрагментный анализ — электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «Gene Profile Cattle 2.0».

7.1. Проведение спектральной калибровки

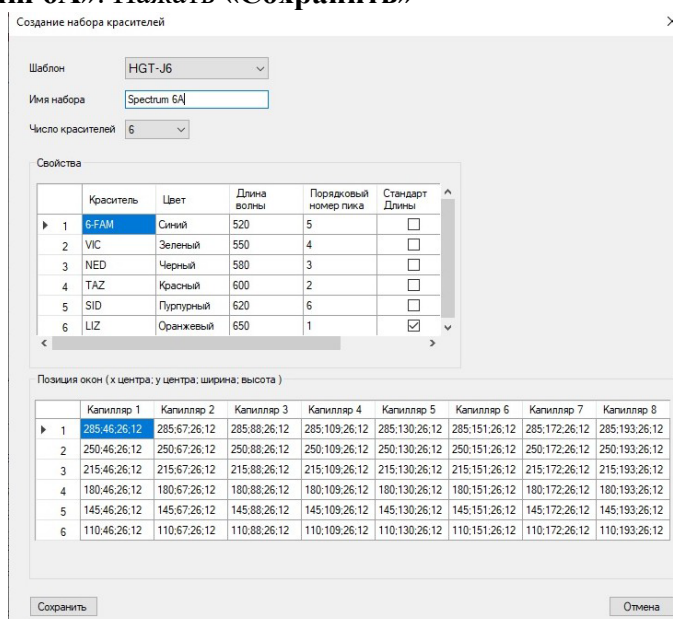
Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с шестичетным калибратором «Spectrum 6A».

7.1.1. Создание набора красителей

1. Открыть управляющую программу **Нанофор 05**.
2. Открыть раздел меню «Вид», выбрать в нём «Наборы красителей».



3. В открывшемся окне нажать на иконку «Создать набор» .
4. В открывшемся окне в поле «Шаблон» выбрать HGT-J6, в поле «Имя шаблона» записать «Spectrum 6A». Нажать «Сохранить»



7.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

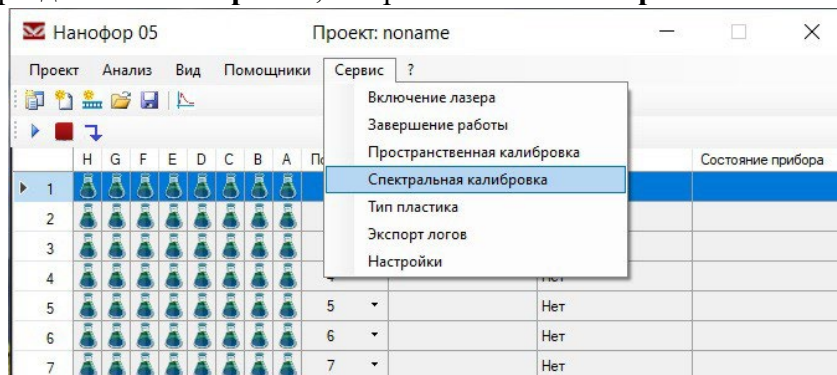
1. В отдельной пробирке смешать Ди-формамид и раствор «Spectrum 6A» по протоколу:

Ди-формамид	80 мкл
Spectrum 6A	8 мкл

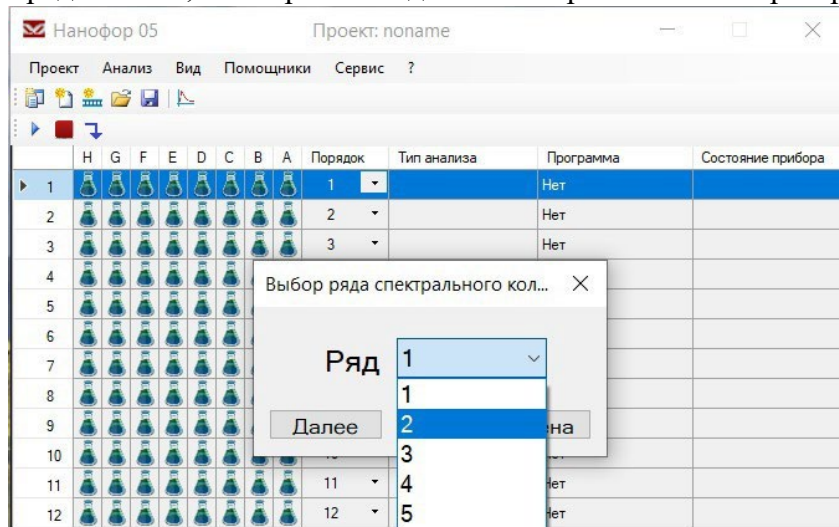
2. Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить **10 мкл** рабочего раствора в лунки.
4. Денатурировать образцы 3 мин при 95 °С.

7.1.3. Запуск спектральной калибровки

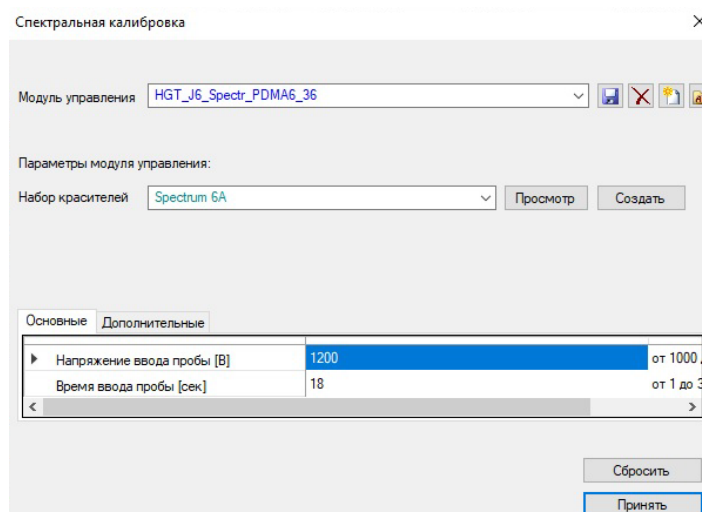
1. Открыть раздел меню «Сервис», выбрать в нём «Спектральная калибровка».



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



3. В качестве модуля управления выбрать «HGT_J6_Spectr_PDMA6_36», подходящий к сочетанию капиллярной сборки и типа полимера. В качестве набора красителей выбрать «Spectrum 6A».



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

7.2. Подготовка продуктов амплификации

1. Приготовить смесь Ди-формамида и размерного стандарта **СД-340** в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Ди-формаמיד	10
Стандарт длины СД-340	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 ПКО.

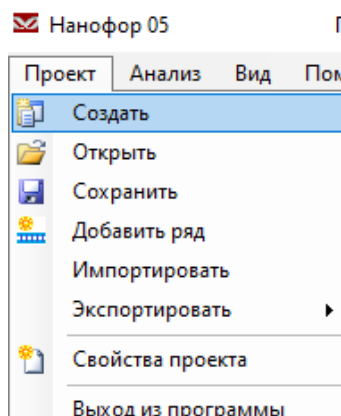
2. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить по **10 мкл** смеси в каждую лунку плашки/стрипа.
4. Внести в смесь по 1 мкл ПЦР-продукта.
5. Закрыть плашку/стрип.
6. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
7. Денатурировать образцы 3 мин при 95 °С.
8. Собрать плашку и загрузить в генетический анализатор в соответствии с руководством пользователя.

ВАЖНО! Инжекция 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 по 10 мкл Ди-формамида.

7.3. Запуск фрагментного анализа

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

1. Открыть программу **SeqPI**, в верхнем меню нажать кнопку «**Проект**». В открывшейся вкладке выбрать «**Создать**».



2. В окне «**Свойство проекта**» необходимо заполнить поля «**Оператор**» и «**Имя проекта**», затем нажать кнопку «**Принять**».

3. В окне «**Описание проекта**» внести названия образцов (если в лунке нет образца, необходимо поставить знак минуса «-»). Кликнуть два раза на ячейку в строке **ПА** под заполненным рядом и установить программу анализа.

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

4. В случае если установлен модуль «**GP Cattle 2.0**», использовать его. Если модуль не установлен, использовать следующие значения: тип анализа – «**Фрагментный**», модуль управления – «**FA_450**», набор красителей – «**Spectrum6A**».

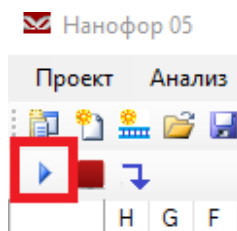
Рекомендуемые параметры электрофореза в зависимости от длины капилляров и типа полимера представлены в таблице 3:

Таблица 3 – Рекомендуемые параметры электрофореза.

Длина капилляров	36 см		50 см	
Вид полимера	ПДМА-4	ПДМА-6	ПДМА-4	ПДМА-6
Напряжение ввода пробы [В]	1200			
Время ввода пробы [сек]	20			
Напряжение электрофореза [В]	15000			
Время электрофореза [сек]	1200	1700	2300	3000
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	600	700	900	1000

ПРИМЕЧАНИЕ – В зависимости от прибора значения параметров электрофореза могут отличаться.

5. Чтобы сохранить установленный модуль для дальнейшего использования, нажмите на кнопку с синей дискетой. В графе «**Имя файла**» задайте «**GP Cattle 2.0**» и нажмите «**Сохранить**». В дальнейшем для запуска будет достаточно выбрать модуль управления – «**GP Cattle 2.0**».
6. В правом нижнем углу нажать кнопку «**Принять**».
7. Кликнуть по клавише запуска электрофореза.



8. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (AB3500/AB3500XL)

8.1. Проведение спектральной калибровки

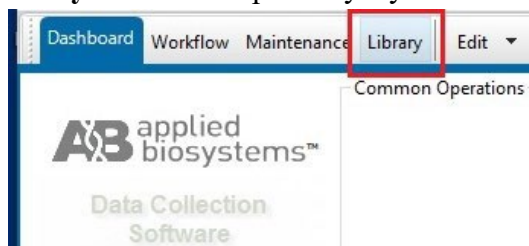
Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с шестичетным калибратором «**Spectrum6A**».

ВАЖНО! Получение корректных результатов возможно только при использовании специализированного деионизованного формамида для электрокинетической инъекции образцов высокой степени очистки.

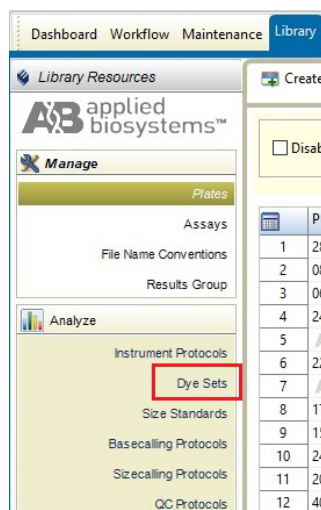
8.1.1. Создание DyeSets

1. Открыть программу **Data Collection Software**.

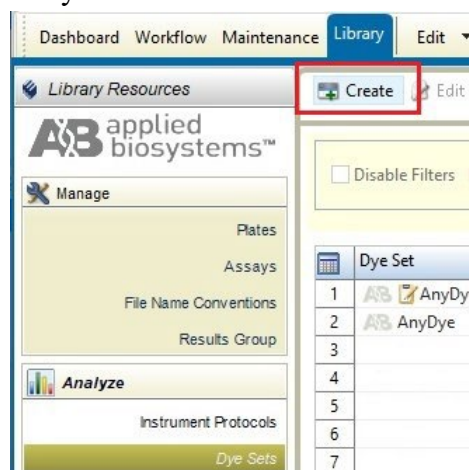
2. Кликнуть по иконке «Library» в левом верхнем углу окна.



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



4. В верхней части нажать кнопку «Create».



5. В открывшемся окне в поле «Dye Set Name» написать «Spectrum 6A», в поле «Chemistry» из выпадающего списка выбрать «Matrix Standard», а в поле «Dye Set Template» из выпадающего списка выбрать «J6».
6. На вкладке «Parameters» в разделе «Matrix Condition Number Upper Limit» установить значение – 11.0

Create New Dye Set

Setup a Dye Set

* Dye Set Name

* Chemistry

* Dye Set Template

Arrange Dyes

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

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

Close Save

7. Нажать кнопку «Save» для сохранения Dye Set «Spectrum 6A».

8.1.2 Подготовка раствора спектрального калибратора

1. В отдельной пробирке смешать Ди-формамид и раствор «Spectrum 6A» по протоколу:

	AB3500	AB3500XL
Ди-формамид	80 мкл	240 мкл
Spectrum 6A	8 мкл	24 мкл

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

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

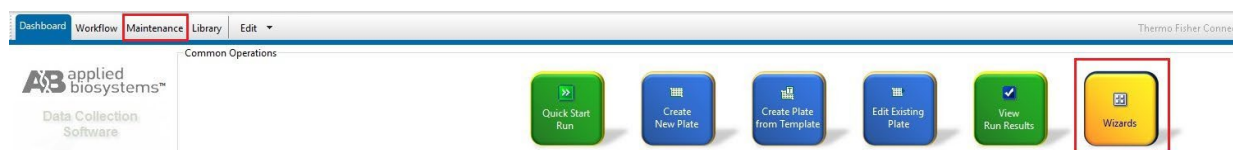
ПРИМЕЧАНИЕ - В случае 24-капиллярного генетического анализатора – внести раствор в три ряда 96-луночного планшета (возможно внесение в 1-3, 4-6, 7-9, 10- 12 ряды планшета) или в стрипованные пробирки. В случае 8-капиллярного генетического анализатора – внести раствор в ряд 96-луночного планшета или в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

4. Денатурировать образцы 3 мин при 95 °С.

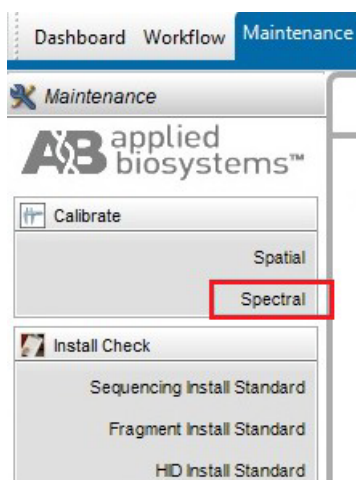
5. Установить 96-луночный планшет или стрипованные пробирки с раствором калибратора **Spectrum 6A** в прибор для капиллярного электрофореза.

8.1.3 Запуск спектральной калибровки

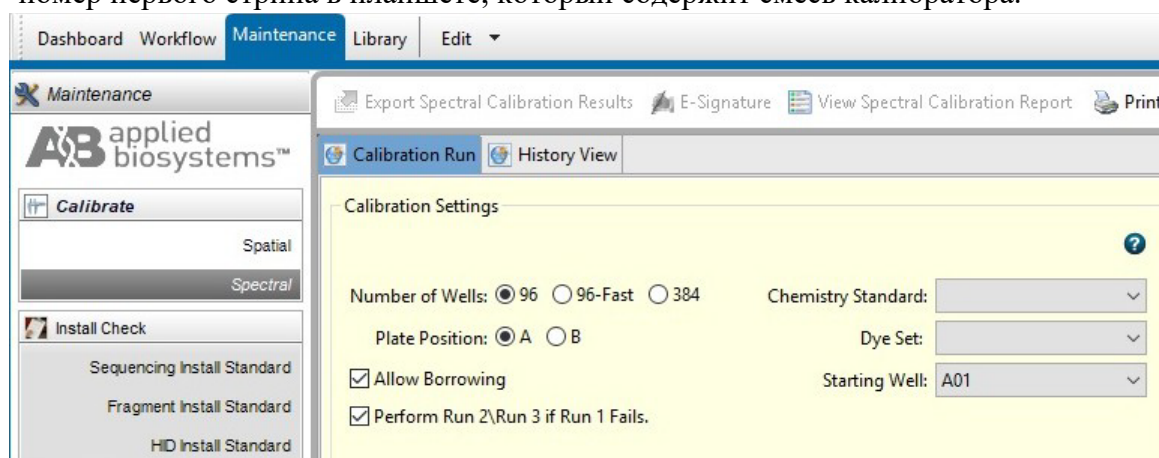
1. Открыть программу **Data Collection Software**. Кликнуть по клавише «Maintenance» в верхней строке или «Wizard».



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



- 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 «Spectrum 6A», а в поле «Starting Well» указать номер первого стрипа в планшете, который содержит смесь калибратора.



- Нажать на кнопку «Start Run» для запуска спектральной калибровки.
- После завершения калибровки нажать кнопку «Accept» в нижней части окна.

8.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

- Приготовить смесь Ди-формамида и размерного стандарта СД-340 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Ди-формаимид	10
Стандарт длины СД-340	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 ПКО.

2. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить по **10 мкл** смеси в каждую лунку плашки/стрипа.
4. Внести в смесь по 1 мкл ПЦР-продукта.
5. Заккрыть плашку/стрип.
6. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
7. Денатурировать образцы 3 мин при 95°C.
8. Собрать плашку и загрузить в генетический анализатор в соответствии с руководством пользователя.

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 формамида.

8.3. Запуск фрагментного анализа

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

Параметры	Рекомендуемое значение
Injection Voltage, [kVolts]	1.2
Injection Time, [sec.]	20
Run Voltage, [kVolts]	15

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.

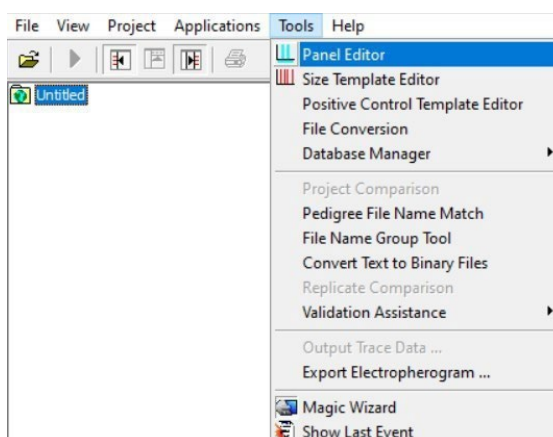
9. АНАЛИЗ ДАННЫХ

9.1. Анализ данных в программах GeneMarker и GeneMarker HID

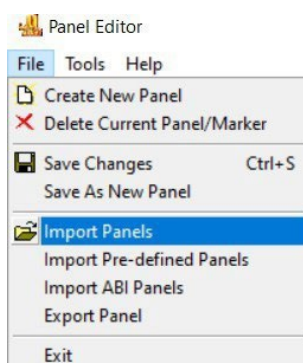
9.1.1. Импорт файлов для анализа данных

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

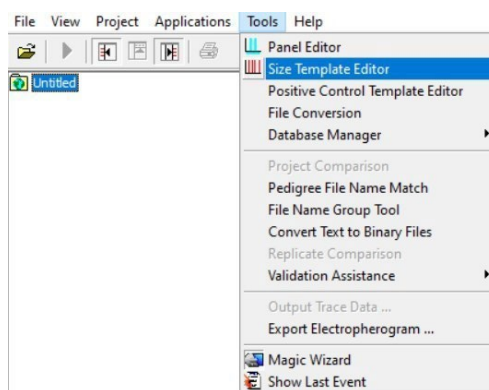
1. Запустить программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в выпавшем списке «**Panel Editor**».



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



3. Выбрать папку с файлом панели (Gr_Cattle_2.0) и подгрузить его в программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**.
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**».



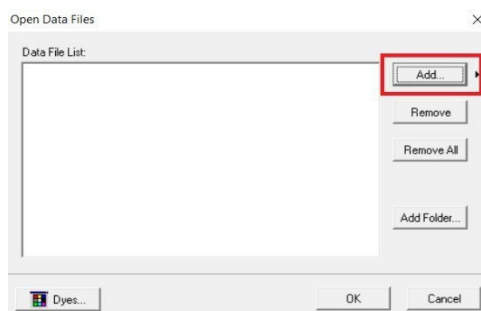
7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (СД-340) и подгрузить его в программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**.
8. Закрывать окно «**Size Template Editor**».

9.1.2. Создание проекта анализа данных

1. В верхнем меню программы выбрать «**File**», в выпавшем списке «**Open Data**». Либо заново запустить программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**. Кликнуть по «**Open Data**» в окне «**Start your project**».



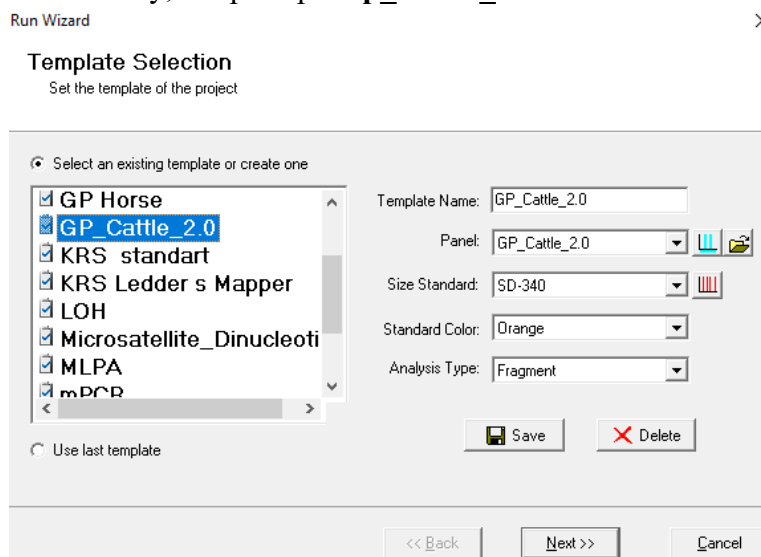
2. Нажать «**Add**» и загрузить нужные файлы.



3. После добавления файлов нажать «OK».
4. Выбрать «Run» в окне «Run». Или запустить анализ, нажав на клавишу «Run Project» в верхнем меню.



5. В открывшемся окне «Run Wizard» из списка шаблонов выбрать шаблон (template) для модификации, нажать на него левой кнопкой мыши. Для программы **GeneMarker** в графе «Analysis Type» выбрать тип анализа «Fragment», в **GeneMarker HID** такой опции нет. В графе «Panel» выбрать панель «Gp_Cattle_2.0», в графе «Size Standard» выбрать размерный стандарт «SD-340», указать цвет краски размерного стандарта и дать новое имя шаблону, например «Gp_Cattle_2.0». Нажать «Next».



6. В следующем окне выбрать настройки в соответствии с указанными на скриншотах – для **GeneMarker** слева и **GeneMarker HID** справа. Нажать «Next».

The first screenshot shows the 'Data Process - Fragment Analysis' window. It has two main sections: 'Raw Data Analysis' and 'Allele Call'. In 'Raw Data Analysis', 'Auto Range (frame)' is checked with Start: 0 and End: 60000. 'Smooth' is checked, 'Enhanced Smooth' is unchecked. 'Saturation Repair' and 'Baseline Subtraction' are checked. 'Enhanced Baseline Subtraction' is unchecked. 'Pull-up Correction' and 'Spike Removal' are checked. In 'Size Call', 'Local Southern' is selected. In 'Allele Call', 'Auto Range (bps)' is checked with Start: 100 and End: 1000. 'Peak Detection Threshold' is set to 300. 'Min Intensity' is 300 and 'Max Intensity' is 60000. 'Percentage' is 1 and 'Global Max' is checked. 'Local Region %' is 25 and 'Local Max' is checked. 'Stutter Peak Filter (%)' is checked with Left: 90 and Right: 30. 'Plus-A Filter' is checked. The second screenshot shows the 'Data Process - HID Analysis' window. In 'Raw Data Analysis', 'Auto Range (frame)' is checked with Start: 0 and End: 10000. 'Smooth' is checked, 'Enhanced Smooth' is unchecked. 'Baseline Subtraction' has 'Superior' and 'Classic' checked, 'Enhanced' is unchecked. 'Pull-up Correction', 'Spike Removal', 'Saturation Detection', and 'Saturation Repair' are all checked. In 'Size Call', 'Local Southern' is selected. In 'Allele Call', 'Auto Range (bps)' is checked with Start: 60 and End: 600. 'Max Intensity' is 32500. 'Peak Detection Threshold' is '?' and 'Dye Specific' is unchecked. 'Min Intensity' is 300 and 'Percentage' is 20. 'Global Max' is checked. A note at the bottom says: 'Note: Use Panel Editor to set Min Intensity and % Global Max for peaks within Markers'.

7. В следующем окне выбрать настройки в соответствии с указанными на скриншотах – для **GeneMarker** слева и **GeneMarker HID** справа. Два раза нажать «Back» и вернуться к первому окну шаблона.

The third screenshot shows the 'Additional Settings - Fragment Analysis' window. 'Allelic Ladder' is set to 'NONE'. 'Positive Control Template' is set to 'NONE'. 'Allele Evaluation' has 'Peak Score' with 'Reject' at 1.00, 'Check' at 20.00, and '< Pass'. 'AFIP - Unconfidence at Rightside: Score' is 40. The fourth screenshot shows the 'Additional Settings - HID Analysis' window. 'Allelic Ladder' is set to 'NONE'. 'P.C. Template 1' and 'P.C. Template 2' are both set to 'NONE'. 'Allele Evaluation' has 'Peak Score' with 'Reject' at 1.00, 'Check' at 7.00, and '< Pass'. 'Mixture Evaluation' has 'Valid Mixture Peak Percentage' at 0% and 'Min Mixture Marker Number' at 3. On the right, 'Auto Select Best Ladder' is checked with 'Allow Match # Variance' at 0, 'Max Average Size Diff' at 0.40, and 'Use Ladder Library' unchecked. 'Min Heterozygosity' is 0.50. 'Auto Panel Adjustment' is checked. 'Sample Quality Sensor' is unchecked with 'Q' Allele and 'S' Allele fields empty.

8. В открывшемся первом окне «Run Wizard» еще раз проверить все настройки и нажать

Run Wizard

X

Template Selection

Set the template of the project

The 'Template Selection' dialog box has a radio button 'Select an existing template or create one' which is selected. Below it is a list box containing several templates: GP Horse, GP_Cattle_2.0 (highlighted), KRS standart, KRS Ledder s Mapper, LOH, Microsatellite_Dinucleoti, MLPA, and mPCR. Below the list box is a radio button 'Use last template' which is not selected. To the right of the list box, there are fields for 'Template Name' (GP_Cattle_2.0), 'Panel' (GP_Cattle_2.0), 'Size Standard' (SD-340), 'Standard Color' (Orange), and 'Analysis Type' (Fragment). At the bottom right are 'Save' and 'Delete' buttons. At the bottom of the dialog are '<< Back', 'Next >>', and 'Cancel' buttons.

«Save». Теперь в списке шаблонов появился новый шаблон анализа для работы с набором «GP_Cattle_2.0», для последующих анализов можно выбирать его без дополнительных корректировок.

9. Для анализа текущего проекта нужно два раза нажать «Next», в последнем окне – «OK».

9.1.3. Анализ размерного стандарта

1. Необходимо убедиться, что у всех образцов правильно подписан размерный стандарт. Для этого в верхней панели нужно нажать на кнопку «Size Calibration».



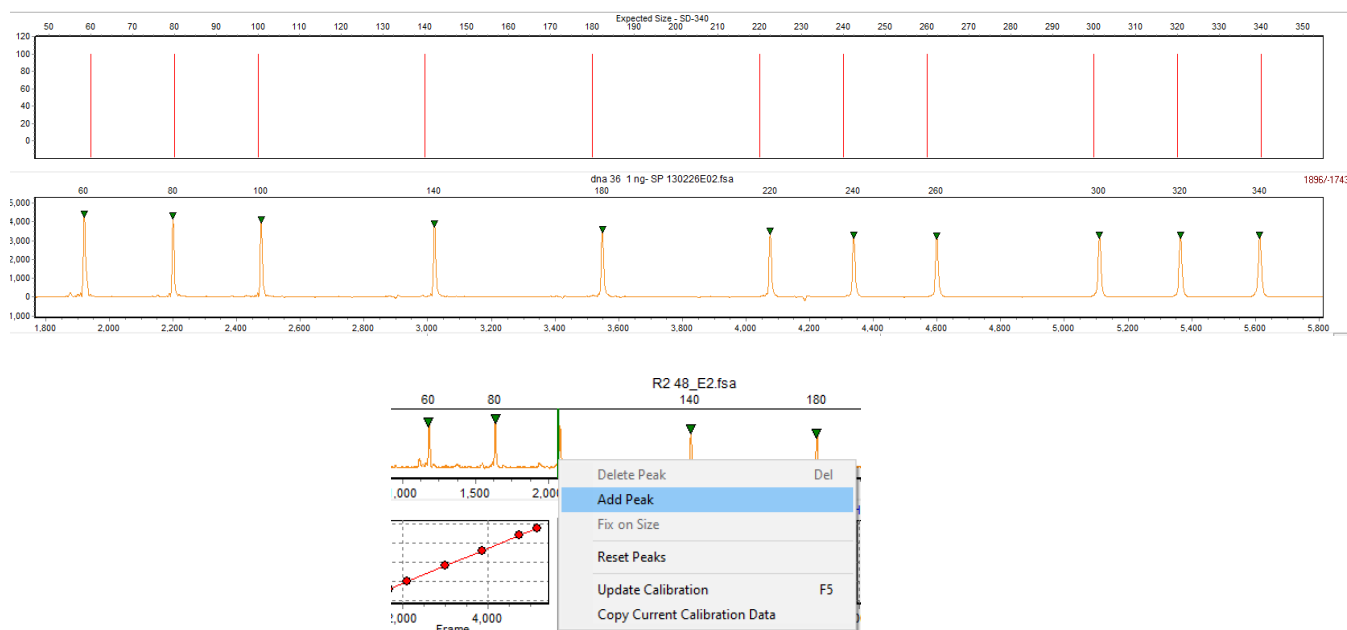
2. В открывшемся окне «Calibration Charts» проверить все образцы по списку и убедиться, что оценка качества размерного стандарта не ниже 96 баллов из 100. Если это верно для всех образцов, то дальнейшие действия не требуются, окно можно закрыть.

No.	Sample Name	Score
1	KPC_POS_A4.fsa	98
2	KPC_POS_B4.fsa	98
3	KPC_POS_C4.fsa	98
4	KPC_POS_D4.fsa	98
5	KPC_POS_E4.fsa	98
6	KPC_POS_F4.fsa	98
7	KPC_POS_G4.fsa	98
8	KPC_POS_H4.fsa	98

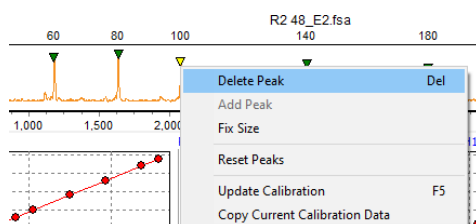
3. Если для каких-то образцов оценка качества размерного стандарта ниже 96 баллов, его необходимо проверить и, возможно, переподписать. Для этого в списке образцов следует выбрать нужный образец нажатием левой кнопки мыши.

No.	Sample Name	Score
1	KPC_POS_A4.fsa	98
2	KPC_POS_B4.fsa	98
3	KPC_POS_C4.fsa	98
4	KPC_POS_D4.fsa	98
5	KPC_POS_E4.fsa	75
6	KPC_POS_F4.fsa	98
7	KPC_POS_G4.fsa	98
8	KPC_POS_H4.fsa	98

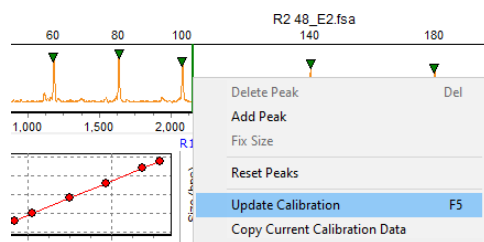
4. На рисунке ниже верхний график – это виртуальный размерный стандарт, построенный программой для проверки, на него нужно ориентироваться визуально. Нижний график – размерный стандарт выбранного образца. Нужно убедиться, что паттерн подписанных пиков нижнего графика совпадает с паттерном пиков верхнего графика. Подписанные пики имеют зеленые треугольники на вершинах.
5. 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.



6. Лишние пики можно удалить, нажав на них правой кнопкой мыши и выбрав «**Delete Peak**».

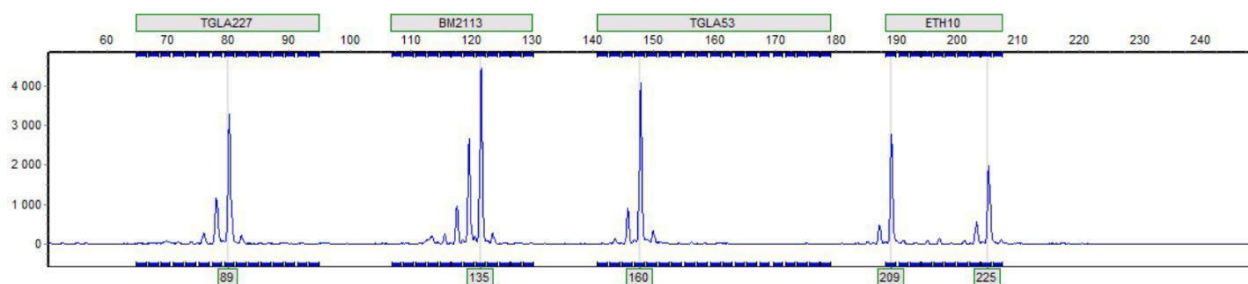


7. По окончании корректировки пиков стандарта выбранного образца нужно правой кнопкой мыши нажать на свободное поле между пиками и в выпадающем меню выбрать «**Update Calibration**». Повторить процедуру для всех образцов, качество размерного стандарта которых ниже 96 баллов. Закрыть окно «**Calibration Charts**» и приступить к анализу **ПКО**.

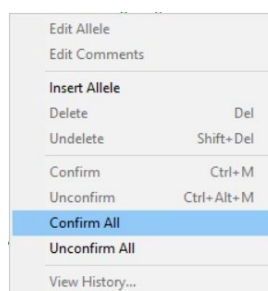


9.1.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

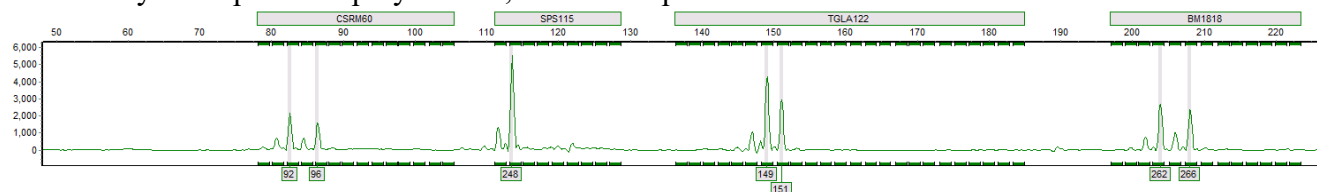
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с **ПКО**.
2. В верхнем меню выбрать канал «**Blue**», используя клавишу «**Show Dye**».
3. Убедиться, что всем пикам **ПКО** по каналу «**Blue**» присвоено верное значение аллеля. Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «**DELETE**».



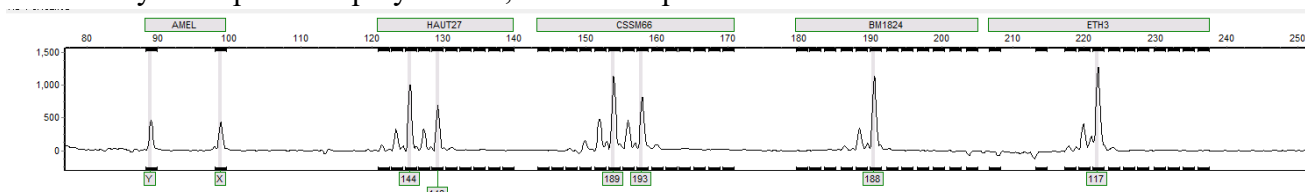
4. Если остались желтые или красные подписи пиков, их нужно принять при условии, что они верные. Правой кнопкой мыши нажать на пустое поле графика, без пиков, и в выпавшем меню выбрать «Confirm all».



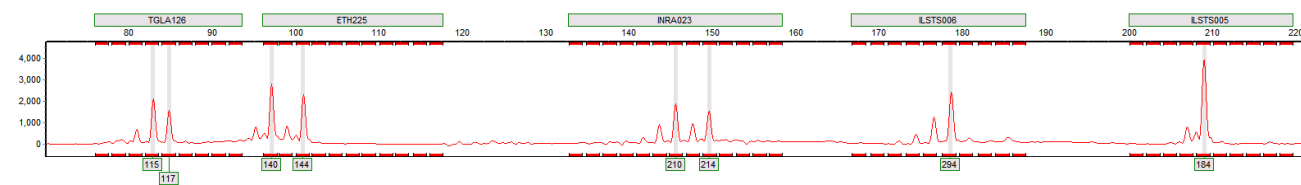
5. В верхнем меню выбрать канал «Green», используя клавишу «Show Dye».
6. Убедиться, что всем пикам ПКО по каналу «Green» присвоено верное значение аллеля. Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «DELETE». Если остались желтые или красные подписи пиков, их нужно принять при условии, что они верные.



7. В верхнем меню выбрать канал «Yellow», используя клавишу «Show Dye».
8. Убедиться, что всем пикам ПКО по каналу «Yellow» присвоено верное значение аллеля. Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «DELETE». Если остались желтые или красные подписи пиков, их нужно принять при условии, что они верные.



9. В верхнем меню выбрать канал «Red», используя клавишу «Show Dye».
10. Убедиться, что всем пикам ПКО по каналу «Red» присвоено верное значение аллеля. Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «DELETE». Если остались желтые или красные подписи пиков, их нужно принять при условии, что они верные.



11. В верхнем меню выбрать канал **«Purple»**, используя клавишу **«Show Dye»**.
12. Убедиться, что всем пикам **ПКО** по каналу **«Purple»** присвоено верное значение аллеля. Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки **«DELETE»**. Если остались желтые или красные подписи пиков, их нужно принять при условии, что они верные.

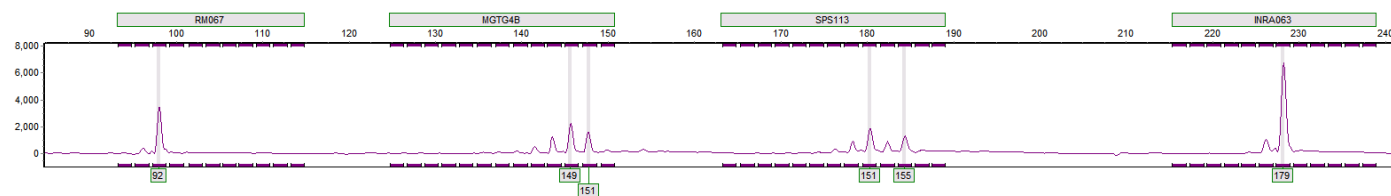
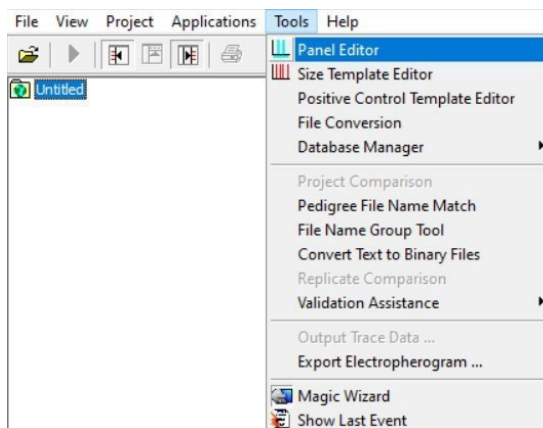


Таблица 4. Аллельное состояние положительного контрольного образца (ПКО)

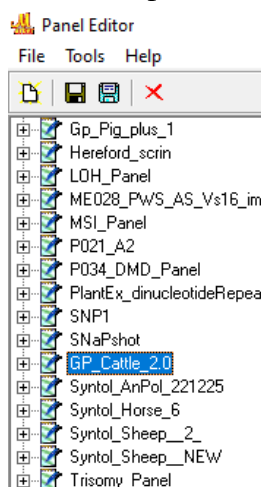
Канал детекции	Локус	Хромосома	Аллельное состояние, (п.н.)
Blue	TGLA227	18	89
	BM2113	2	135
	TGLA53	16	160
	ETH10	5	209/225
Green	CSRM60	10	92/96
	SPS115	15	248
	TGLA122	21	149/151
	BM1818	23	262/266
Yellow	AMEL	Y/X	Y/X
	HAUT27	26	144/148
	CSSM66	14	189/193
	BM1824	1	188
	ETH3	19	117
Red	TGLA126	20	115/117
	ETH225	9	140/144
	INRA023	3	210/214
	ILSTS006	7	294
	ILSTS005	10	184
Purple	RM067	4	92
	MGTG4B	4	149/151
	SPS113	10	151/155
	INRA063	18	179

ПРИМЕЧАНИЕ – Аллельное состояние характеризуется длиной ампликонов, единицей измерения которых является пара нуклеотидов (п.н.)

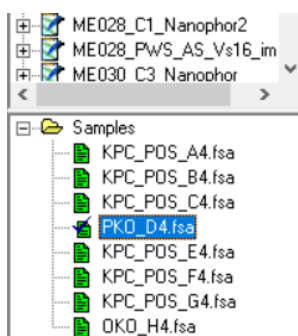
13. Если присвоенные значения аллелей не соответствуют значениям в таблице 4, необходимо настроить панель.
14. Для настройки панели необходимо в верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor».



15. В списке панелей слева выбрать панель для редактирования. Если используете программу **GeneMarker HID**, то не выбирайте самую верхнюю панель. Нужная панель находится в общем списке по алфавитному порядку.

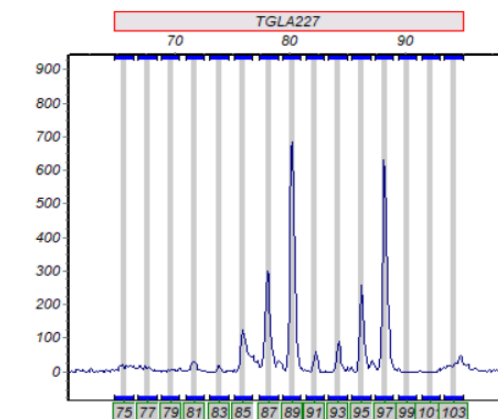


16. В списке образцов ниже выбрать только положительные контроли (ПКО). С лишних образцов снять галочки выделения, нажав дважды левой кнопкой мыши.



17. В окне панели проверить все маркеры на правильность определения аллелей. Маркеры,

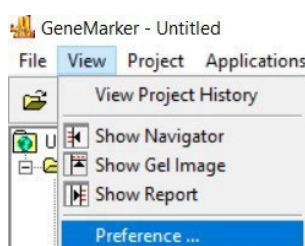
в которых аллели ПКО определились неверно, сдвинуть до правильного положения. Для передвижения маркера нажать и удерживать клавишу «Shift», нажать и удерживать левой кнопкой мыши название маркера на полосе сверху и мышью передвинуть маркер в нужное положение. Таким же образом можно передвигать и отдельные аллели внутри маркера. Между красками панели можно переключаться, нажимая на цветовое обозначение краски в верхнем меню. В окне панели возможно такое же масштабирование, как на графиках образцов в основном рабочем окне.



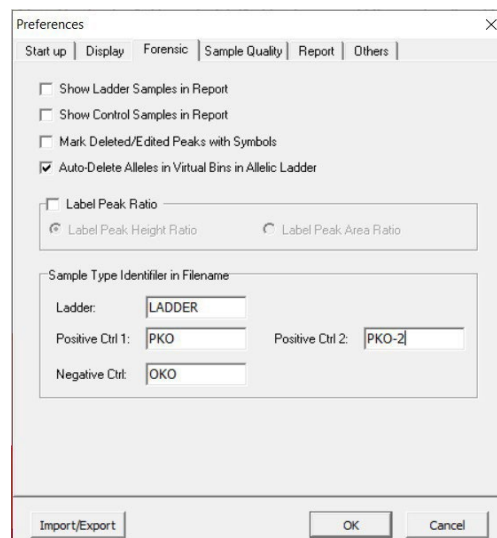
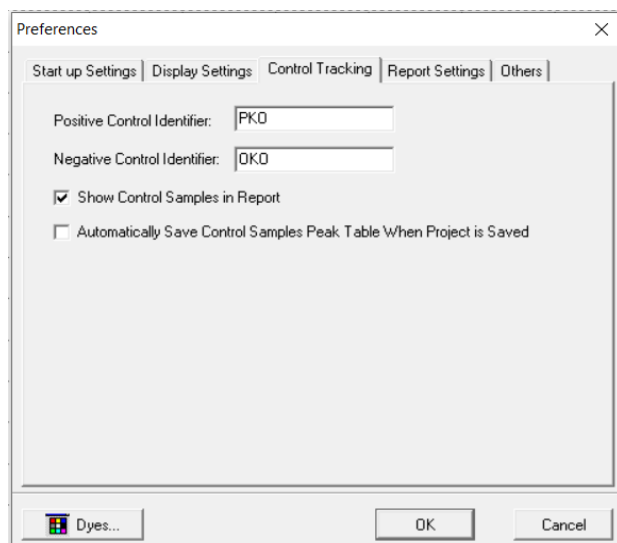
18. По окончании редактирования панели необходимо ее сохранить, нажав на значок сохранения в верхнем меню. Можно также сохранить отредактированную панель под новым названием в меню «File», выбрав «Save As New Panel».
19. Далее нужно закрыть окно «Panel Editor» и заново перезапустить анализ проекта, в стандартном шаблоне выбрав отредактированную панель вместо обычной.

9.1.5. Внесение профиля ПКО в шаблон анализа.

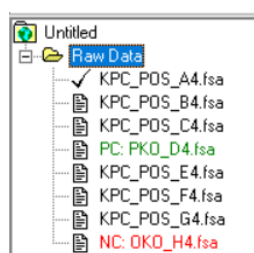
1. Нужно определиться со стандартным названием для положительных контролей в лаборатории, например «РКО». Таким образом, все образцы ПКО в каждом проекте должны именоваться «РКО». То же – для отрицательных контролей.
2. В верхнем меню выбрать «View», в выпавшем списке «Preferences».



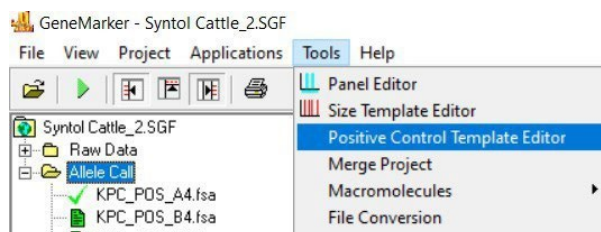
3. В открывшемся окне «Preferences» открыть вкладку «Control Tracking» для GeneMarker или вкладку «Forensic» для GeneMarker HID. В поле «Positive Control Identifier» ввести стандартное наименование для положительного контроля (ПКО), а в поле «Negative Control Identifier» – для отрицательного контроля (ОКО). Нажать «OK».



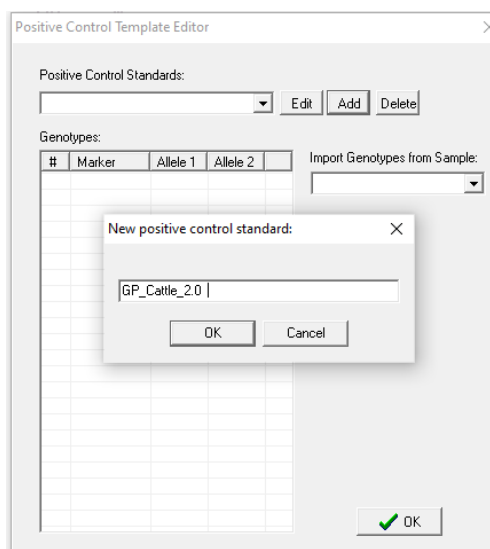
4. Теперь программа будет определять **ПКО** и **ОКО** в проекте автоматически. Если при загрузке каких-то образцов контроли не определились, нужно еще раз проверить их стандартные наименования в окне «**Preferences**». Также любому образцу в проекте можно принудительно назначить статус **ПКО** или **ОКО**: нажать на него в списке правой кнопкой мыши, в выпадающем меню нажать «**Set Sample Type**» и выбрать соответствующий тип образца.



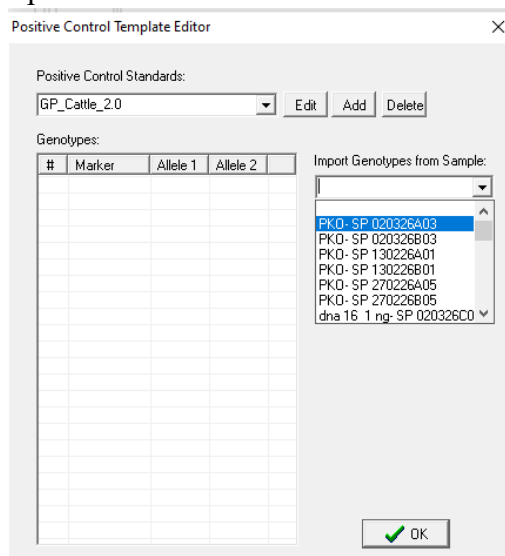
5. В верхнем меню программы выбрать «**Tools**», в выпавшем списке «**Positive Control Template Editor**».



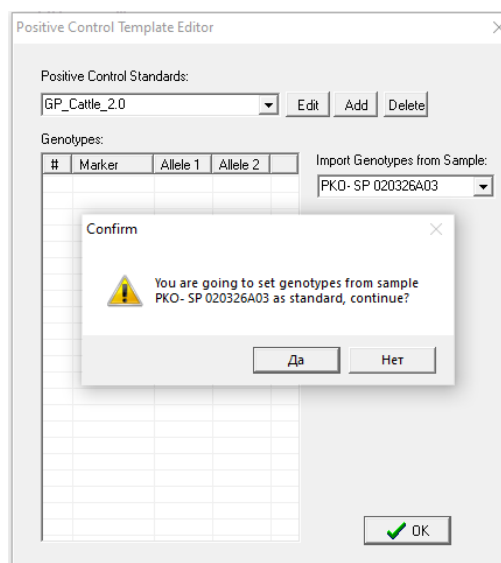
6. В открывшемся окне нажать кнопку «**Add**». В появившемся поле ввести название для текущего положительного контроля к конкретному набору. Удобнее всего их различать по названию наборов. Таким образом, для набора «**Gene Profile Cattle 2.0**» подходящим названием **ПКО** будет, например, «**GP_Cattle_2.0**». Нажать «**OK**».



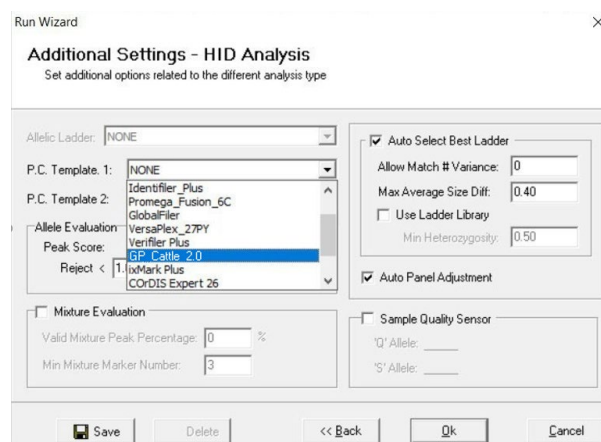
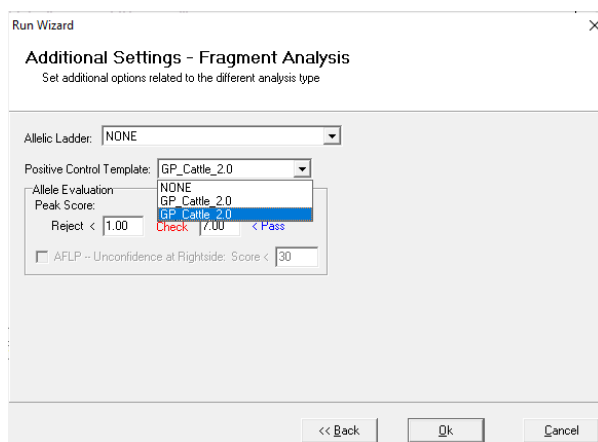
7. В строке «**Import Genotypes from Sample**» выбрать проверенный положительный контроль из текущего проекта.



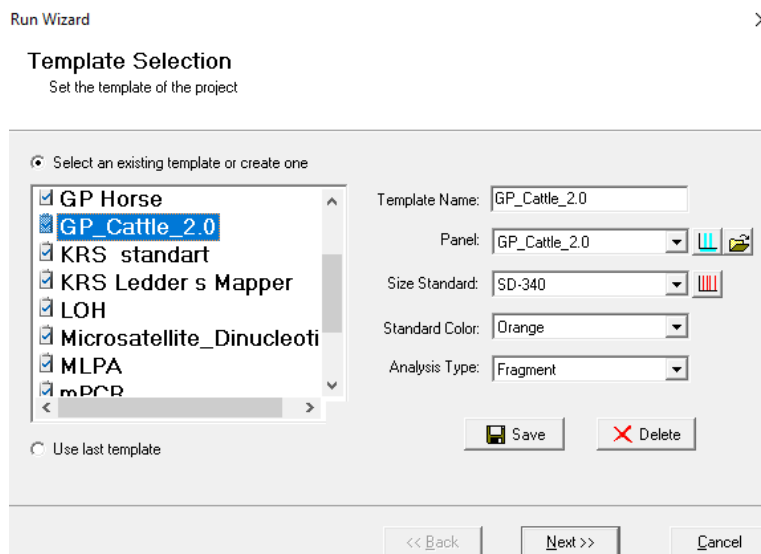
8. В открывшемся окне нажать «**Да**». Далее нажать «**OK**» внизу окна.



9. Запустить анализ, нажав на клавишу «**Run Project**» в верхнем меню. В открывшемся окне «**Run Wizard**» из списка выбрать нужный шаблон (**GP Cattle 2.0**), два раза нажать «**Next**». В графе «**Positive Control Template**»/«**P. C. Template 1**» выбрать подходящий положительный контроль в соответствии с названием, которое было дано ему в пункте 6. Два раза нажать «**Back**» и вернуться к первому окну шаблона.



10. Нажать «**Save**». Теперь при анализе по этому шаблону программа будет автоматически проверять получившийся генотип **ПКО**. Проанализировать проект снова – уже с проверкой **ПКО** – можно, два раза нажав «**Next**», а в последнем окне – «**OK**».



9.1.6. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

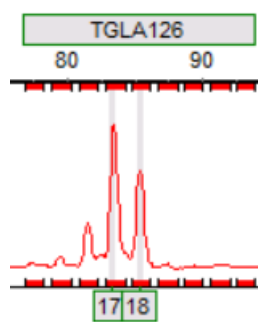
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с **ОКО**.
2. Убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

9.1.7. Анализ образцов

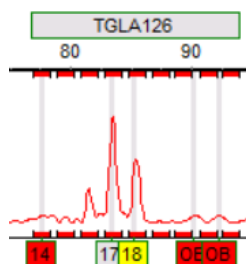
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу образца.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал, используя клавишу «**Show Dye**».
3. Убедиться, что всем пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля.

9.1.8. Исключение из анализа статтеров и артефактных пиков

Микросателлитные локусы, представленные в наборе, несут динуклеотидные повторы, что приводит к образованию высоких статтеров (побочные продукты амплификации, связанные с «проскальзыванием» полимеразы). Они могут достигать до 70 % величины основного пика. В случае наличия двух соседних аллелей в локусе сигнал статтера длинной аллели суммируется с сигналом основного пика короткой аллели, что приводит к дисбалансу по высоте аллелей.

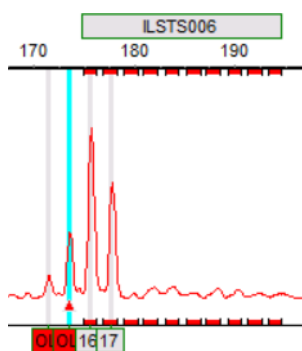


Также возможно присутствие артефактных пиков, связанных с постановкой амплификации напрямую (минуя стадию выделения ДНК).

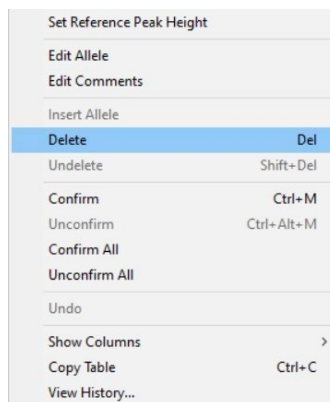


Для исключения из анализа статтеров и артефактных пиков нужно:

1. Навести курсор на пик статтера, выделить его, щелкнув левой клавишей мыши.



2. Нажать правую кнопку мыши и в открывшемся окне выбрать «Delete».

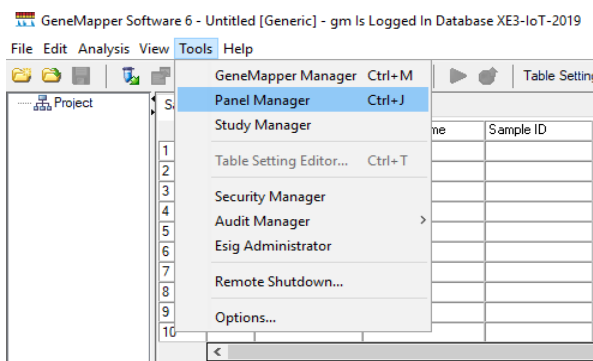


9.2. Анализ данных в Gene Mapper

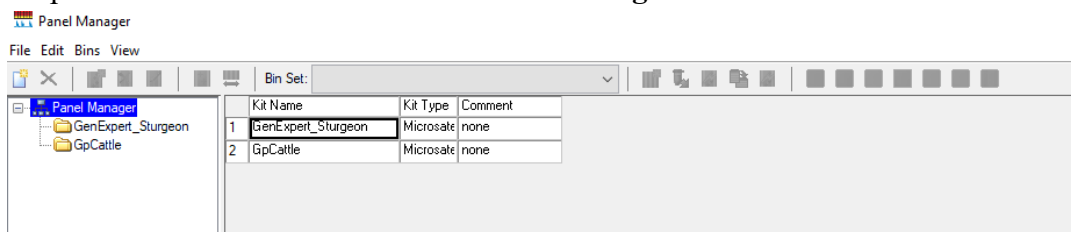
9.2.1. Импорт файлов для анализа данных

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

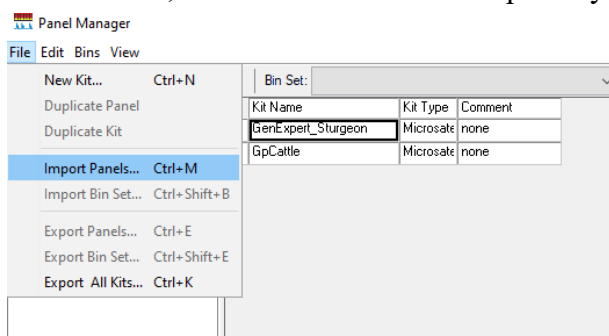
1. Запустить программу **GeneMapper Software 6**, в верхнем меню нажать «**Tools**», в выпавшем списке выбрать «**Panel Manager**».



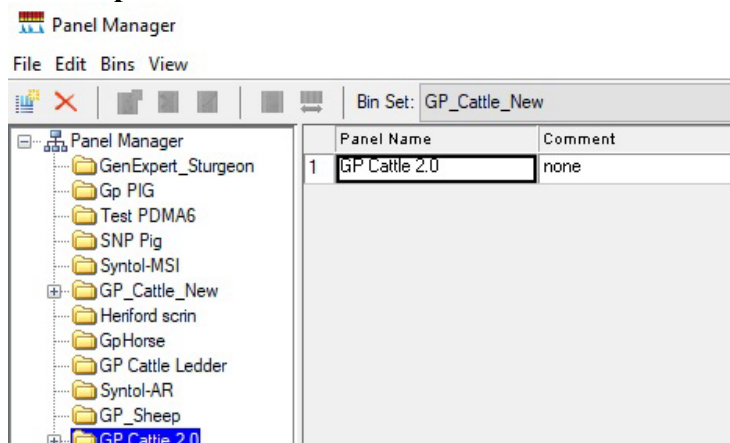
2. В открывшемся окне слева нажать «**Panel Manager**».



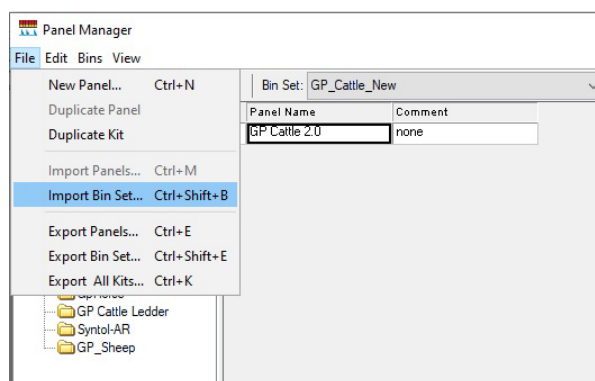
3. В верхнем меню нажать «**File**», в выпавшем списке выбрать пункт «**Import Panels**».



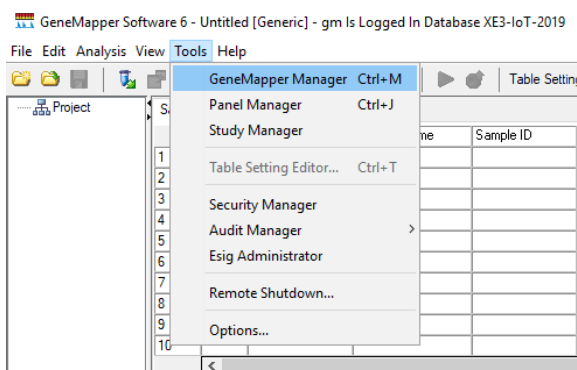
4. Выбрать папку с файлом панели (**GpCattle 2.0**) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».
5. Щелкнуть по папке **GpCattle 2.0**, появившейся в списке «**Panel Manager**».



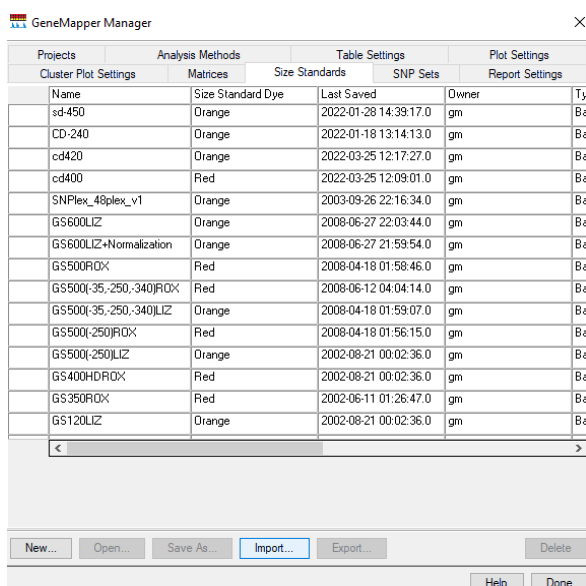
6. В верхнем меню нажать «**File**», в открывшемся списке выбрать пункт «**Import Bin Set**».



7. Выбрать папку с файлом бинов (**GpCattle_2.0_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 (**СД-340**) и подгрузить его в программу нажатием кнопки **«Import»**.
11. Перейти на вкладку **«Analysis Methods»** и нажать кнопку **«Import»**.

GeneMapper Manager

Projects

Analysis Methods

Table Settings

Plot Settings

Cluster Plot Settings

Matrices

Size Standards

SNP Sets

Report Settings

Name	Last Saved	Owner	Instrument	Analysis Type
Gp PIG	2023-07-20 10:49:16.0	gm		Microsatellite
Test PDMA6	2022-05-24 14:29:07.0	gm		Microsatellite
GenExpert Sturgeon	2022-02-24 15:34:37.0	gm		Microsatellite
SNPlex_Rules_3730	2004-09-21 22:39:02.0	gm	3730	SNPlex Rules 3730
SNPlex_Rules_3130	2008-04-18 01:59:07.0	gm	3130	SNPlex Rules 3130
SNPlex_Model_3730	2004-09-21 22:38:48.0	gm	3730	SNPlex Model 3730
SNAPshot Default	2003-07-26 05:10:08.0	gm		SNAPshot®
Microsatellite Default	2005-06-09 00:50:00.0	gm		Microsatellite
AFLP Default	2004-07-17 03:21:19.0	gm		AFLP
SNP Pig	2025-12-15 11:20:28.0	gm		Microsatellite
GP Cattle 2.0	2026-02-27 15:10:33.0	gm		Microsatellite
Gene Profile Horse	2025-03-07 16:56:34.0	gm		Microsatellite
cat	2025-03-05 10:29:43.0	gm		Microsatellite
Herford	2024-10-10 16:55:54.0	gm		Microsatellite
GpCattle	2022-02-09 15:11:24.0	gm		Microsatellite
SynkolAR	2024-03-26 12:19:56.0	gm		Microsatellite
Synkol-MSI-methods	2024-07-18 18:45:40.0	gm		Microsatellite
GP_Sheep_method	2024-04-24 18:32:58.0	gm		Microsatellite

New ...

Open ...

Save As ...

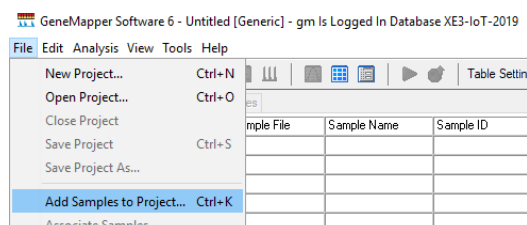
Import ...

Export ...

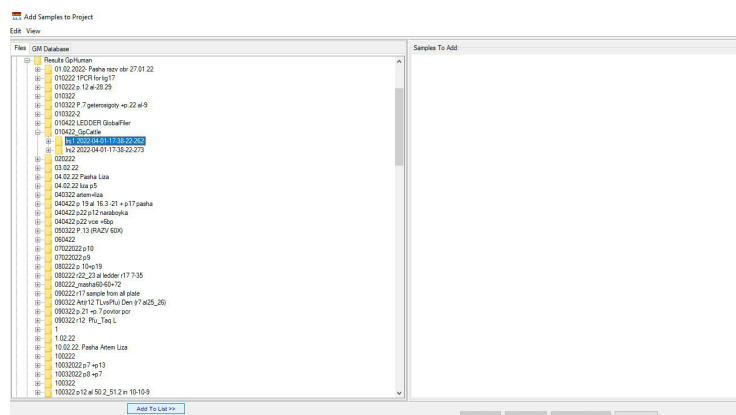
12. Выбрать папку с файлом метода (**GpCattle 2.0_method**) и подгрузить его в программу нажатием кнопки **«Import»**. Закрыть окно **«GeneMapper Manager»**.

9.2.2. Анализ данных

1. В программе **GeneMapper Software 6** 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.



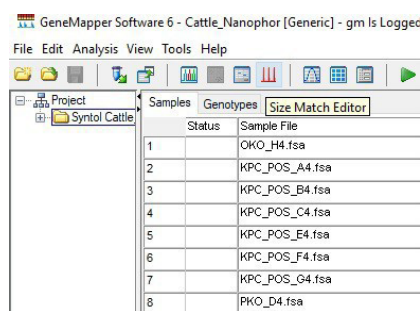
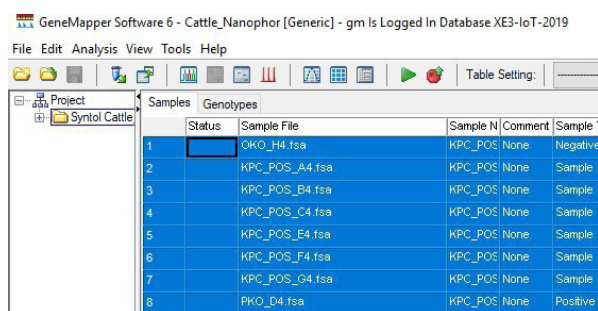
3. Выбранная папка появится в окне справа, внизу нажать кнопку «Add».
4. Для образцов выбрать ранее импортированные в программу: «Panel» – GpCattle 2.0», «Size Standard» – СД-340, «Analysis Method» – Gp_Cattle_2.0 method.
5. Запустить анализ.

9.2.3. Анализ размерного стандарта

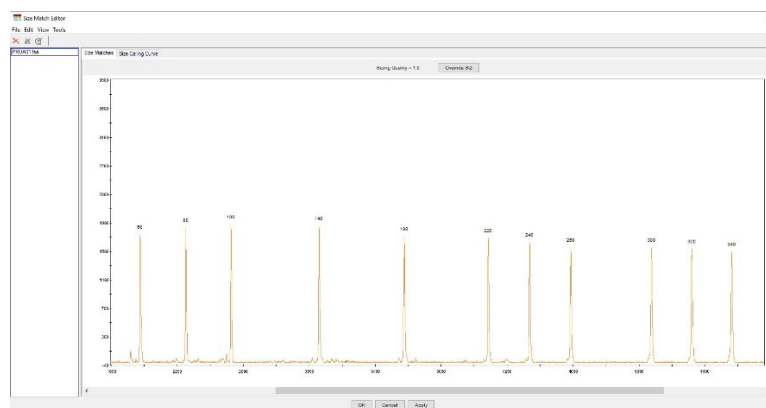
1. Необходимо убедиться, что у всех образцов правильно подписан размерный стандарт. Для этого нужно проверить значения SQ для всех образцов в проекте. Если SQ – зеленый квадрат, то размерный стандарт этого образца подписан верно. Если SQ – желтый треугольник или красный круг, то стандарт необходимо проверить.

Well	SE	SGO	ARNM	SFNF	MINF	SNF	SOS	SQ
A07								
B07								
C07								
D07								

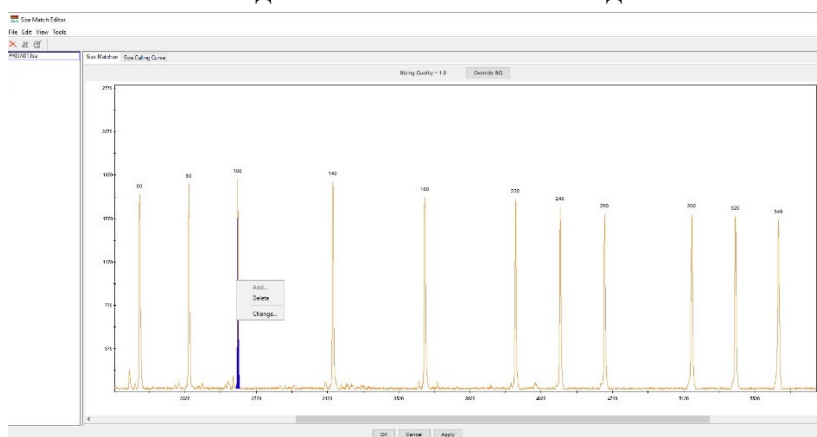
2. Для проверки стандартов нужно выделить все проверяемые образцы и в верхней панели нажать на кнопку «Size Match Editor».



3. В открывшемся окне из списка слева нужно поочередно выбирать образцы для проверки нажатием левой кнопки мыши. На графике справа будут отображаться их размерные стандарты.



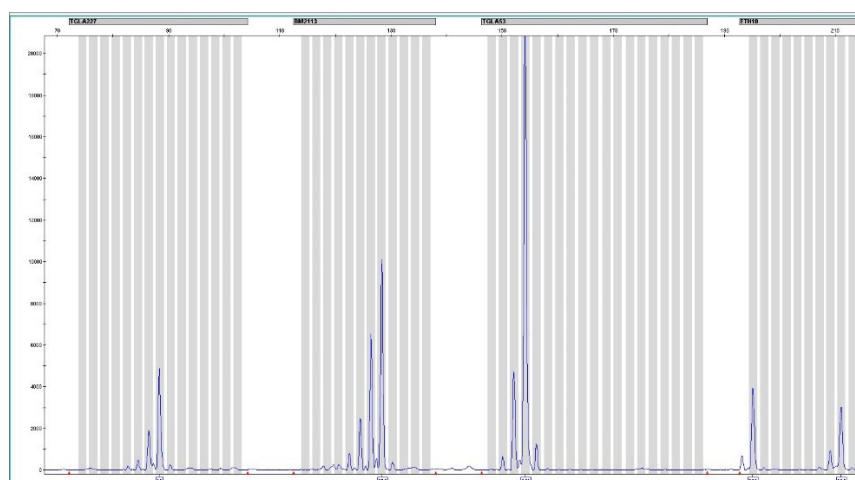
4. Неправильно подписанный пик можно удалить или переименовать, нажав на него правой кнопкой мыши. Неподписанный пик можно подписать.



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 ПКО.

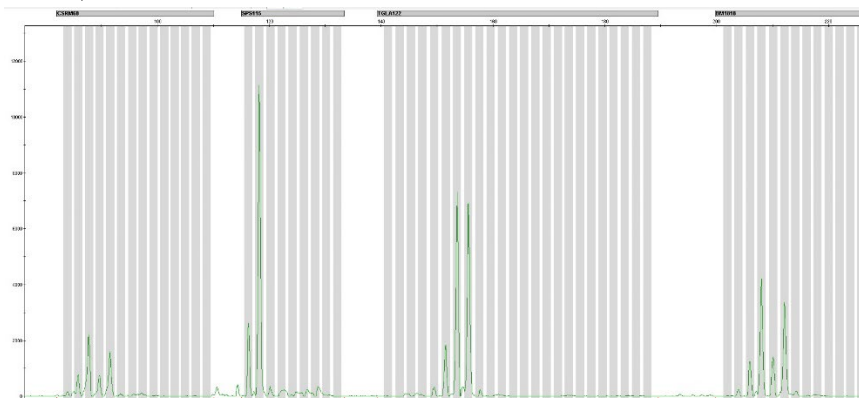
9.2.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

1. Открыть образец ПКО.
2. В верхнем меню отключить все каналы, кроме «Blue». Убедиться в том, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 4). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «DELETE».

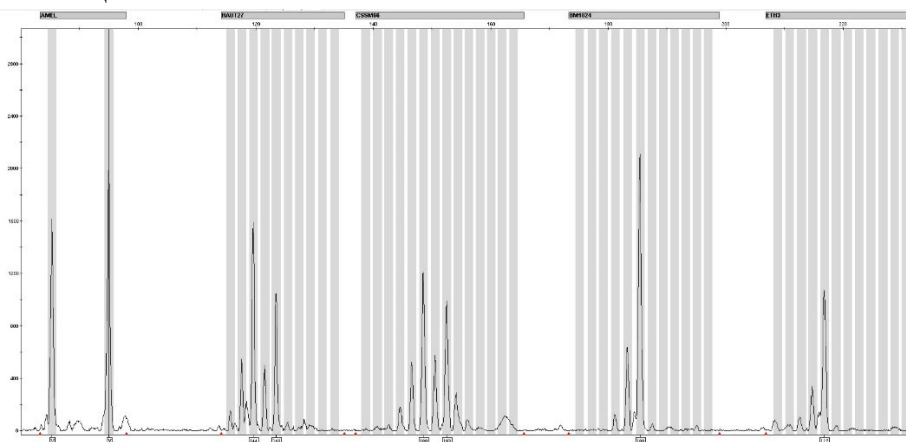


3. В верхнем меню отключить все каналы, кроме «Green». Убедиться в том, что всем

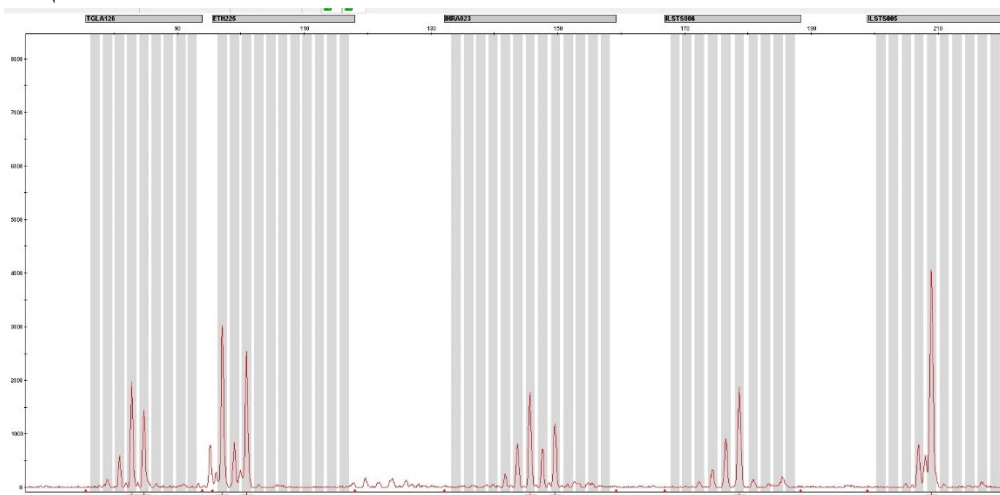
пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 4). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки **«DELETE»**.



4. В верхнем меню отключить все каналы, кроме «Yellow». Убедиться в том, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 4). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки **«DELETE»**.

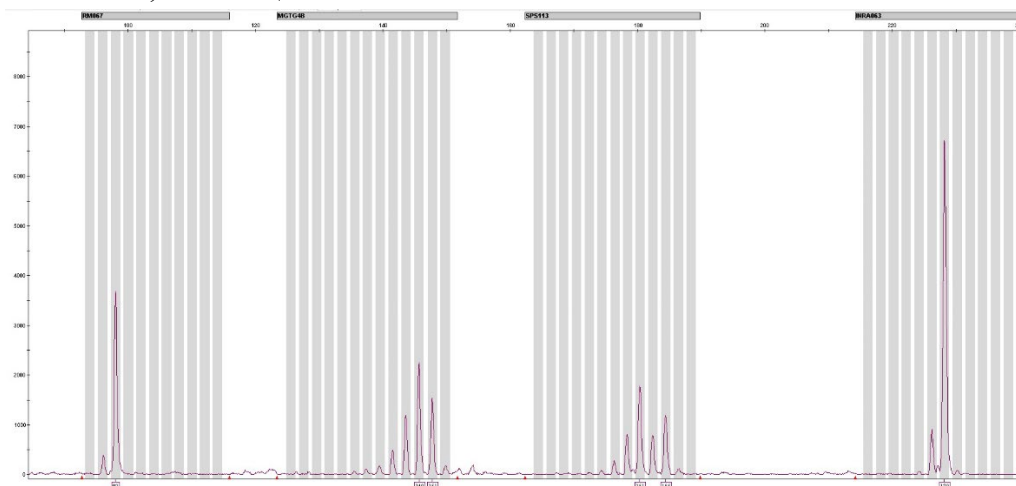


5. В верхнем меню отключить все каналы, кроме «Red». Убедиться в том, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 4). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки **«DELETE»**.

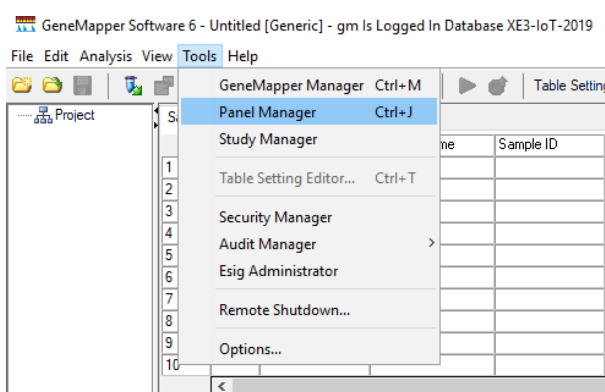


6. В верхнем меню отключить все каналы, кроме «Purple». Убедиться в том, что всем

пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 4). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «**DELETE**».



7. Если присвоенные значения аллелей не соответствуют значениям в таблице, необходимо настроить панель.
8. Для настройки панели необходимо закрыть окно с образцом. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в открывшемся списке выбрать «**Panel Manager**».



9. В открывшемся окне выбрать папку **GpCattle 2.0**. В ней открыть папку **GpCattle 2.0**, в результате отобразится список всех локусов.

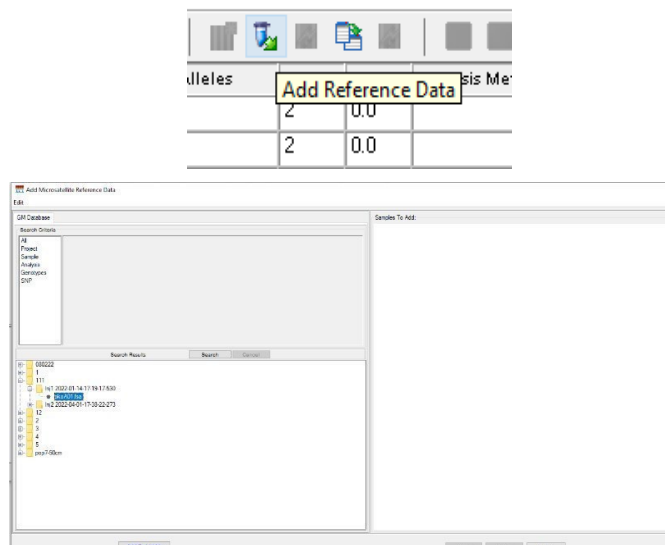
Panel Manager

Bin Set: GP_Cattle_2.0

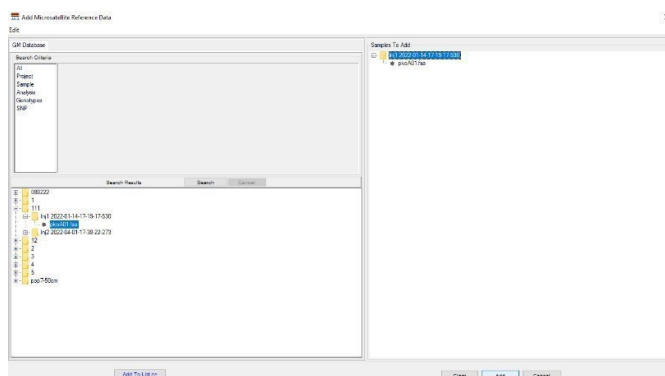
Universal	Marker Name	Dye Color	Min Size	Max Size	Control Alleles	Marker Repeat	Marker	Analysis Method
1	TGLA227	Blue	72.11	104.25		2	0.0	
2	ETH10	Blue	132.78	214.31		2	0.0	
3	BM2113	Blue	112.53	138.09		2	0.0	
4	TGLA53	Blue	146.35	186.94		2	0.0	
5	CSRM60	Green	81.98	110.15		2	0.0	
6	SPS115	Green	115.01	133.44		2	0.0	
7	TGLA122	Green	139.29	189.57		2	0.0	
8	BM1818	Green	199.77	227.74		2	0.0	
9	HAUT27	Yellow	114.17	135.09		2	0.0	
10	CSSM66	Yellow	137.03	165.64		2	0.0	
11	BM1824	Yellow	173.26	198.91		2	0.0	
12	ETH3	Yellow	206.84	232.4		2	0.0	
13	TGLA126	Red	75.51	93.87		2	0.0	
14	ETH225	Red	95.5	117.97		2	0.0	
15	INRA023	Red	132.12	159.24		2	0.0	
16	ILSTS006	Red	166.9	188.32		2	0.0	
17	ILSTS005	Red	198.94	221.4		2	0.0	
18	RM067	Purple	92.75	115.9		2	0.0	
19	MGT648	Purple	123.37	151.75		2	0.0	
20	SPS113	Purple	162.36	189.86		2	0.0	
21	INRA063	Purple	214.22	239.97		2	0.0	
22	AMEL	Yellow	83.27	97.97		2	0.0	

10. В верхнем меню нажать кнопку «**Add Reference Data**».

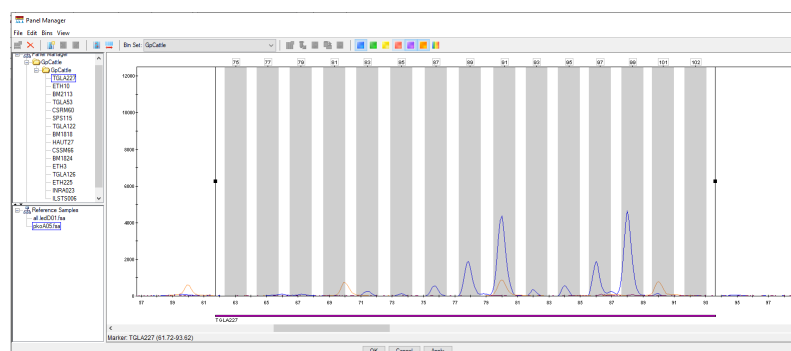
11. В открывшемся окне внизу слева выбрать папку с данными постановки, в ней – образец ПКО. Нажать «Add To List».



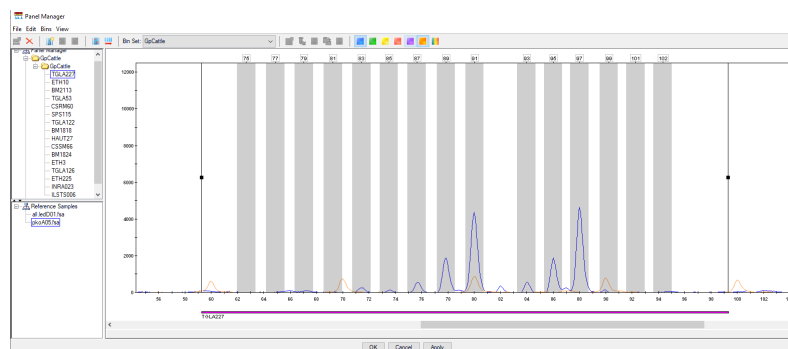
12. Справа появятся выбранные папка и файл. Внизу справа нажать кнопку «Add».



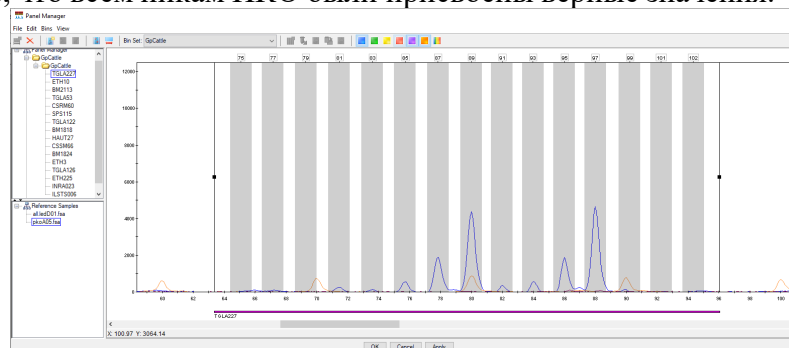
13. В предыдущем окне слева появятся выбранные референсные образцы. Найти в списке локус, который необходимо редактировать, внизу выбрать образец ПКО.



14. 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.



15. Проверить, что всем пикам ПКО были присвоены верные значения.



16. После настройки значений локуса нажать кнопку «Apply».
17. Повторить действия со всеми локусами, которым были неверно присвоены аллельные состояния.
18. Нажать кнопку «OK».

9.2.5. 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.

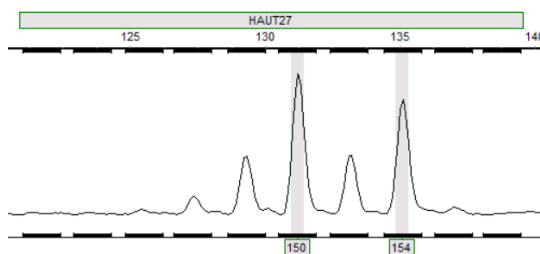
9.2.6. Анализ образца

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

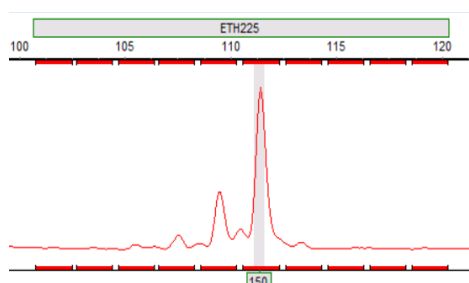
10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аллельный статус исследуемого образца оценивается по каждому локусу отдельно. При анализе каждого локуса необходимо учитывать следующие пункты:

- В пределах одного локуса возможно два варианта аллельного состояния: гомозиготный – один пик в локусе, гетерозиготный – два пика в локусе.

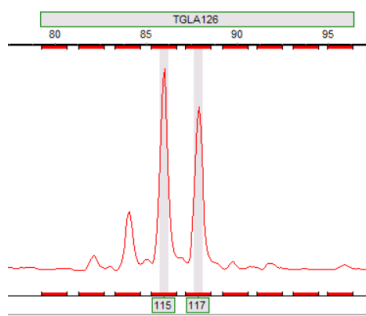


Гетерозиготный генотип 150/154 аллель в локусе HAUT27



Гомозиготный генотип 150 аллель в локусе ETH225

- Локусы, используемые в наборе GeneProfile Cattle 2.0, динуклеотидны: аллели локуса отличаются на два нуклеотида. Вследствие этого для каждой аллели характерны высокие статтеры – продукты амплификации, которые обусловлены «проскальзыванием» полимеразы при амплификации микросателлитных участков. Размер статтера будет отличаться от размера целевого аллеля на два нуклеотида. Уровень сигнала статтера обычно не превышает 50 –70 % аллеля.
- Если в локусе аллели отличаются на один повтор (2 нуклеотида), статтер более длинного аллеля накладывается на целевой пик короткого аллеля, тем самым увеличивая уровень его сигнала.



Гетерозиготный генотип в локусе TGLA126 с наложением статтера аллели 117 на аллель 115

Для идентификации животного необходимо сравнить его заявленный генотип с генотипом, полученным в ходе исследования. Аллельное состояние по каждому локусу не должно отличаться:

Локус	Заявленный генотип	Генотип, полученный в ходе исследования
TGLA227	89/97	89/97
BM2113	133/139	133/139
TGLA53	160	160
ETH10	213/221	213/221
CSRM60	100/102	100/102
SPS115	248/254	248/254
TGLA122	143/147	143/147
BM1818	266/268	266/268
AMEL	Y/X	Y/X
HAUT27	142/154	142/154
CSSM66	187/189	187/189
BM1824	180	180
ETH3	119/125	119/125
TGLA126	115/117	115/117
ETH225	140/146	140/146
INRA023	206	206
ILSTS006	288/290	288/290
ILSTS005	178/184	178/184
RM067	98	98
MGTG4B	145	145
SPS113	151/157	151/157
INRA063	195/181	195/181

Если хотя бы в одном из локусов аллельное состояние отличается – это другое животное:

Локус	Заявленный генотип	Генотип, полученный в ходе исследования
TGLA227	89/97	75 /97
BM2113	133/139	133/139
TGLA53	160	160
ETH10	213/221	213/221
CSRM60	100/102	100/102
SPS115	248/254	248/254
TGLA122	143/147	143/147
BM1818	266/268	266/268
AMEL	Y/X	Y/X
HAUT27	142/154	142/154
CSSM66	187/189	187/189
BM1824	180	180
ETH3	119/125	119/125

TGLA126	115/117	115/117
ETH225	140/146	140/146
INRA023	206	206
ILSTS006	288/290	288/290
ILSTS005	178/184	178/184
RM067	98	98
MGTG4B	145	145
SPS113	151/157	151/157
INRA063	195/181	195/181

Для подтверждения или опровержения родства сравнивают генотипы животных. Если в каждом локусе генотипа **животного 1** одна из аллелей общая с **животным 2**, результат исследований свидетельствует о том, что между **животным 1** и **животным 2** родство подтверждено (родитель/теленки):

Локус	Животное 1, аллельное состояние	Животное 2, аллельное состояние
TGLA227	89/97	75/ 89
BM2113	133/ 139	139
TGLA53	160	154/ 160
ETH10	213/221	213/225
CSRM60	100/102	100/112
SPS115	248/ 254	254/262
TGLA122	143/ 147	137/ 147
BM1818	266/268	256/ 266
AMEL	Y/X	Y/X
HAUT27	142/ 154	154
CSSM66	187/189	181/ 187
BM1824	180	180/190
ETH3	119/125	119
TGLA126	115/117	117/125
ETH225	140/146	140/158
INRA023	206	198/ 206
ILSTS006	288/ 290	290/302
ILSTS005	178/184	178/192
RM067	98	98
MGTG4B	145	145
SPS113	153/ 155	155/157
INRA063	171/ 181	177/ 181

Если хотя бы в одном из локусов нет общей аллели, результат исследований свидетельствует о том, что между **животным 1** и **животным 2** родство не подтверждено:

Локус	Животное 1, аллельное состояние	Животное 2, аллельное состояние
TGLA227	89/97	75/89
BM2113	133/139	139
TGLA53	160	154/160
ETH10	213/221	213/225
CSRM60	<u>100/102</u>	<u>108/112</u>
SPS115	248/254	254/262
TGLA122	143/147	137/147
BM1818	266/268	256/266
AMEL	Y/X	Y/X
HAUT27	142/154	154
CSSM66	187/189	181/187
BM1824	180	180/190
ETH3	119/125	119
TGLA126	115/117	117/125
ETH225	140/146	140/158
INRA023	206	198/206
ILSTS006	288/290	290/302
ILSTS005	178/184	178/192
RM067	98	98
MGTG4B	145	145
SPS113	153/155	155/157
INRA063	171/181	177/181

11. ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

Компоненты набора реагентов (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию необходимо утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять производителю ООО «НПФ Синтол» по адресу: 127550, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 42, тел. (495) 984-69-93, e-mail: syntol@syntol.ru.

13. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Значение
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Использовать до
	Номер по каталогу
	Код партии