

**Набор реагентов «Pig Screen» для обнаружения генетически
детерминированных заболеваний (RYR-синдром, DMD-стресс-
синдром, RN-синдром, ISTS-синдром) свиней методом
капиллярного электрофореза**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



СОДЕРЖАНИЕ

1.	НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
1.1.	Назначение набора.....	4
1.2.	Описание моделей набора.....	4
1.3.	Область применения.....	4
1.4.	Потенциальные пользователи.....	4
1.5.	Принцип метода, положенный в основу работы набора.....	4
2.	ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	5
2.1.	Состав набора.....	5
2.2.	Функциональные характеристики.....	5
3.	УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА.....	5
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	5
5.	ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА	6
6.	ПОДГОТОВКА К АМПЛИФИКАЦИИ	7
6.1.	Подготовка к проведению ПЦР.....	7
7.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (НАНОФОР 05).....	8
7.1.	Проведение спектральной калибровки.....	8
7.1.1.	Создание набора красителей.....	8
7.1.2.	Подготовка раствора спектральной калибровки.....	9
7.1.3.	Запуск спектральной калибровки.....	9
7.2.	Подготовку и загрузка продуктов амплификации.....	10
7.3.	Запуск фрагментного анализа на НАНОФОР 05	10
8.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (AB3500/AB3500XL).....	13
8.1.	Проведение спектральной калибровки	13
8.1.1.	Создание DyeSets	13
8.1.2.	Подготовка раствора спектрального калибратора.....	15
8.1.3.	Запуск спектрального калибратора	16
8.2.	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	16
8.3.	Запуск фрагментного анализа.....	17
9.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	18
9.1.	Анализ данных в программах GeneMarker/ GeneMarker HID	18
9.1.1.	Импорт файлов для анализа данных	18
9.1.2.	Создание проекта анализа данных	19
9.1.3.	Анализ размерного стандарта.....	21
9.1.4.	Анализ положительного контрольного образца (ПКО-wt и ПКО-mt).....	22
9.1.5.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	25
9.1.6.	Анализ образцов.....	26

9.2.	Анализ данных в Gene Mapper	26
9.2.1.	Импорт файлов для анализа данных	26
9.2.2.	Анализ данных	28
9.2.3.	Анализ размерного стандарта.....	29
9.2.4.	Анализ положительного контрольного образца (ПКО)	30
9.2.5.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	33
9.2.6.	Анализ образцов.....	33
9.2.5.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	33
9.2.5.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	33
10.	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	34
11.	ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	35
12.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	35
13.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	35

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Назначение набора

Набор реагентов «Pig Screen» предназначен для обнаружения генетически детерминированных заболеваний свиней: RYR-синдром, DMD-стресс-синдром, RN-синдром, ISTS-синдром.

1.2. Описание набора

Используемые в наборе праймеры мечены красителем Yellow (см. таблицу 1). Стандарт длин СД-340 мечен красителем Orange.

Таблица 1. Характеристика локусов набора «Pig Screen»

Канал детекции	Заболевание	Идентификатор	Аллельное состояние	
			Дикий тип	Мутантный тип
Yellow	RYR-синдром	OMIA ID 000621	C	T
	DMD-стресс-синдром	OMIA ID 001685	C	T
	RN1-синдром	OMIA ID 001085	C	T
	RN2-синдром		C	T
	ISTS-синдром	OMIA ID 001334	WT	MT

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 5 локусов в одной пробирке. Размер амплифицируемых ПЦР-продуктов находится в диапазоне от 95 до 181 пар нуклеотидов.

Набор рассчитан на проведение 100 реакций, включая контрольные образцы.

1.3. Область применения

Набор может быть использован в лабораториях племенных хозяйств для обнаружения генетически детерминированных заболеваний в поголовьях свиней.

1.4. Потенциальные пользователи

К работе с набором допускаются специалисты с высшим или средним медицинским, биологическим или ветеринарным образованием, получившие дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

1.5. Принцип метода, положенный в основу работы набора

В основе работы набора лежит мультиплексная амплификация пяти локусов с последующим анализом длин ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав набора

Таблица 2- Состав набора «Pig Screen»

№	Компонент	Описание	Номинальный объем, мл	Количество
1	РС	Реакционная смесь	1500	1 пробирка
2	СП	Смесь специфических праймеров	500	1 пробирка
3	ПКО-wt	Положительный контрольный образец – ДНК здорового животного (дикий тип)	50	1 пробирка
4	ПКО-mt	Положительный контрольный образец – синтетическая конструкция (мутантный тип)	50	1 пробирка
5	СД-340	Стандарт длин – набор фрагментов известной длины (60, 80, 100, 140, 180, 220, 240, 260, 300, 320, 340)	100	1 пробирка
6	H ₂ O	Деионизованная H ₂ O	1700	1 пробирка

2.2. Функциональные характеристики

Оптимальное количество ДНК в реакцию - 10 нг. Диапазон концентраций ДНК для проведения амплификации от 1,0 до 20 нг в реакцию.

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

Набор реагентов «Pig Screen» специфичен только к ДНК свиньи.

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

Хранение: в защищенном от света месте, при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.

Транспортирование: крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным, воздушным) при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.

Эксплуатация: Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 15 °С до 35 °С и относительной влажности воздуха от 15 % до 75 %. Набор должен применяться в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Набор предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. п. 1.2). 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;
- 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 допускать открытие пробирок с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации;
- 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;
- Центрифуга для микропробирок объемом 0,2 мл или центрифуга для 96-ти луночных ПЦР планшет;
- Штатив для ПЦР-плашек или стрипов объемом 0,2 мл (например, «ПЦР-96», кат. № СТ-12);
- Штатив для пробирок объемом 1,5/2,0 мл (например, «PM-96x1,5/2,0», кат. № СТ-17);
- Набор дозаторов пипеточных переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл;
- Холодильник от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой не выше минус 16 °С;
- Наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл, не содержащие ДНКаз;
- ПЦР-планшеты или микропробирки для ПЦР в стрипах, не содержащие ДНКаз, объемом 0,2 мл;

- Пленка для ПЦР-планшетов или крышки к микропробиркам в стрипах;
- Микроцентрифужные пробирки, не содержащие ДНКазы, объемом 1,5 и 2,0 мл (для приготовления реакционной смеси);
- Центрифуга-вортекс для пробирок объемом 1,5/2 мл
- Полимер для проведения капиллярного электрофореза (ПДМА-4/ ПДМА-6)
- Спектральный калибратор «Spectrum 6A» (HG-705)
- Буфер для проведения капиллярного электрофореза (ТАПС)
- Прибор для проведения ПЦР
- Деионизованный формамид
- Автоматический генетический анализатор (Нанофор 05)
- Емкость для сброса использованных материалов.

6. ПОДГОТОВКА К АМПЛИФИКАЦИИ

6.1. Подготовка к проведению ПЦР

1. Для приготовления рабочей реакционной смеси рассчитать требуемое количество реагентов РС и СП согласно таблице 3.

Таблица 3 – Расход реагентов при приготовлении реакционной смеси

Реагент	Расход реагентов	
	на 1 реакцию, мкл	рекомендуемое количество для N образцов
РС	15,0	15,0 x N
СП	5,0	5,0 x N
ДНК	1-5	
H ₂ O	до конечного объема 25 мкл	

Примечание - С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать по одному положительному контрольному образцу (ПКО-wt и ПКО-mt) и один отрицательный контрольный образец (ОКО). Включить в расчеты приготовления рабочей реакционной смеси дополнительную реакцию для компенсации погрешности пипетирования.

2. Разморозить пробирки с РС и СП, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
3. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем РС и СП (согласно таблице 3), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
4. Внести в микропробирки для ПЦР (планшеты, стрипы объемом 0,2 мл) по 20 мкл приготовленной РС.
5. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в пробирки (на стенку) от 1 до 5 мкл исследуемых образцов, при необходимости, общий объем довести до 25 мкл деионизованной H₂O.
6. В одну из пробирок (планшеты, стрипы) с приготовленной рабочей реакционной смесью внести 5 мкл деионизованной H₂O (отрицательный контрольный образец), во вторую и третью 5 мкл ПКО-wt и ПКО-mt (положительные контрольные образцы).
7. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать 30 с при 3000 об/мин. Убедиться в отсутствии пузырей в микропробирках.

Примечание – В случае наличия пузырьков аккуратно постучать пальцем по микропробиркам для поднятия пузырьков из толщи РС вверх. Снова центрифугировать микропробирки 30 с при 3000 об/мин.

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

Температура	Время	
95 ⁰ С	2 мин	45 циклов
92 ⁰ С	10 с	
63 ⁰ С	1 мин 20с	
60 ⁰ С	20 мин	
12 ⁰ С	1 мин	

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (НАНОФОР 05)

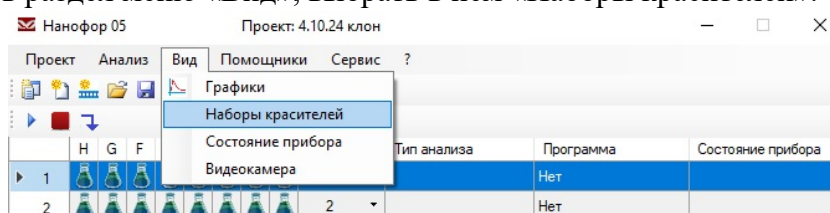
Для получения полного профиля проводится фрагментный анализ – электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «Pig Screen».

7.1. Проведение спектральной калибровки

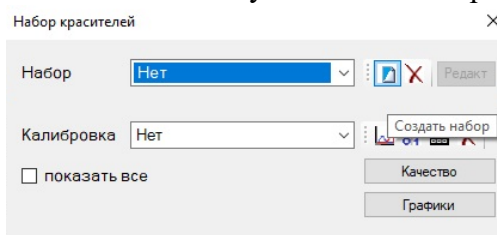
Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с калибратором «Spectrum6A».

7.1.1. Создание набора красителей

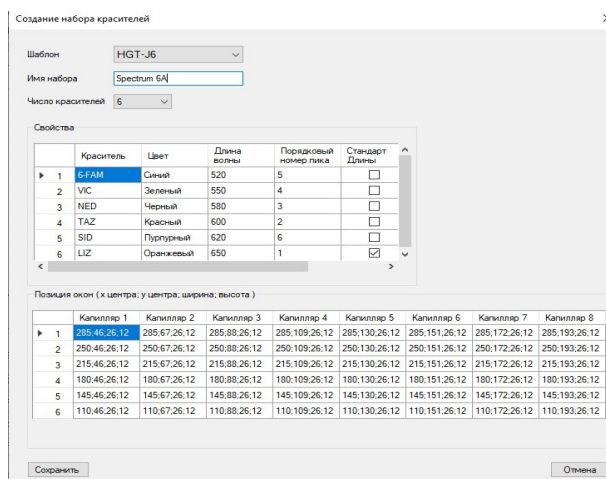
1. Открыть управляющую программу Нанофор 05.
2. Открыть раздел меню «Вид», выбрать в нём «Наборы красителей».



3. В открывшемся окне нажать на иконку «Создать набор»



4. В открывшемся окне в поле «Шаблон» выбрать HGT-J6, в поле «Имя шаблона» записать «GpSpectrum6A». Нажать «Сохранить»



7.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

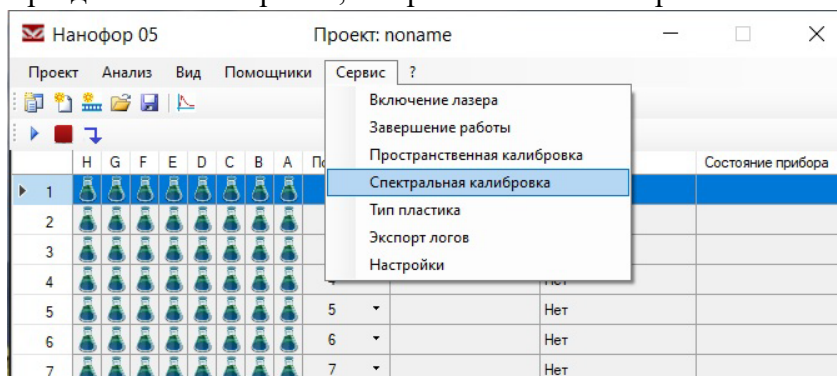
1. В отдельной пробирке смешать Ди-формамид и раствор «Spectrum6A» по протоколу:

Ди-формамид	80 мкл
Spectrum6A	8 мкл

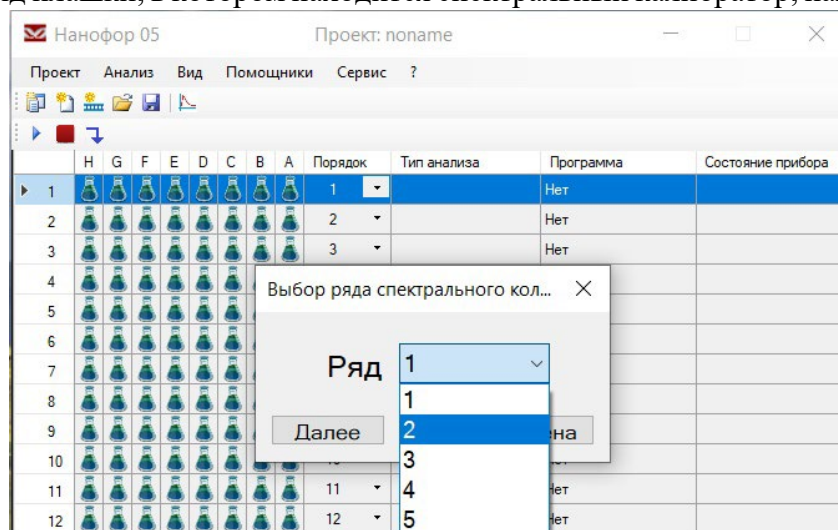
2. Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить 10 мкл рабочего раствора в лунки.

7.1.3. Запуск спектральной калибровки

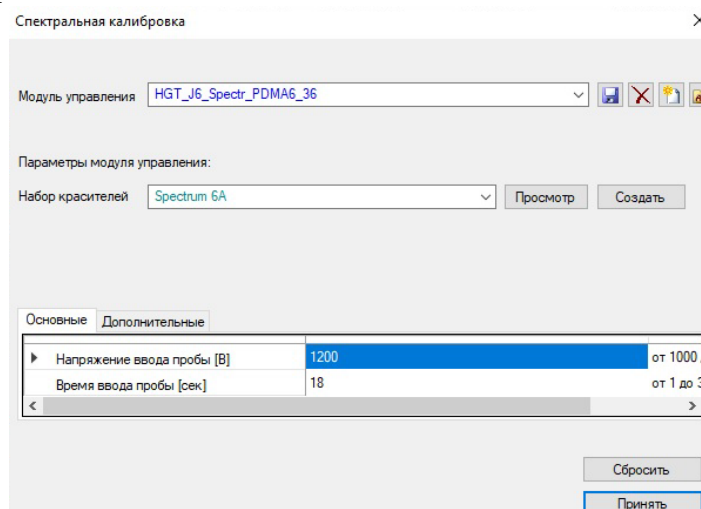
1. Открыть раздел меню «Сервис», выбрать в нём «Спектральная калибровка».



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 «GrSpectrum6A».



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

7.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

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

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Ди-формамид	10
Стандарт длины СД-340	1

Примечание - При расчете объемов компонентов смеси, необходимых на весь анализ, следует учесть, что как минимум две лунки плашки/стрипа при анализе каждой серии образцов должны содержать ПКО-wt и ПКО-mt.

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°C.

Примечание - Инъекция 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 формамида.

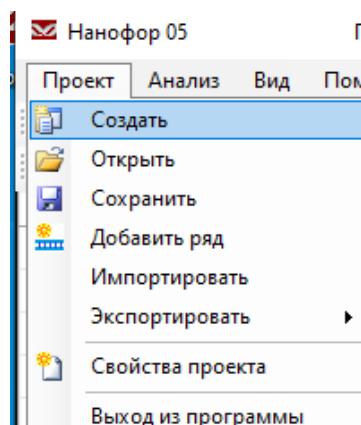
7.3. Запуск фрагментного анализа на Нанофор 05

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе проводится в соответствии с руководством пользователя, предоставляемым производителем. Рекомендуемые параметры электрофореза в зависимости от длины капилляров и типа полимера представлены в таблице:

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.

1. Для запуска проекта необходимо в управляющей программе нажать кнопку «Проект» и в появившейся вкладке выбрать «Создать».



2. Появится окно «Свойство проекта». В нем необходимо заполнить поля «Оператор» и «Имя проекта», затем нажать кнопку «Принять».

Свойства проекта

Оператор

Имя проекта

Путь для резервного сохранения

...

Пластик

Планшет, тип SSI-3425 или SSI-3400

Полимер: ПДМА-6 (с100423)

Дата установки полимера: 21.08.2023

Линейка капилляров : 1221231s (36)

Дата установки капилляров : 23.01.2023

Количество анализов : 1159

Принять

Отмена

- В появившемся окне «Описание проекта» внести названия образцов. Если в лунке нет образца, необходимо поставить знак «-». Кликнуть два раза на ячейку в строке ПА под заполненным рядом и установить программу анализа. После завершения нажать «Принять».

Планшет Таблица

Тип образца
Образец
Применить

Стандарт длин
Нет
Применить

Имя файла
<Name>
Изменить

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

ПА - Программа Анализа

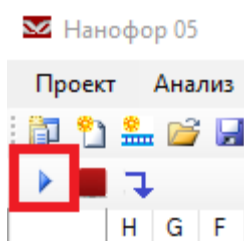
Принять Отмена

- В случае если установлен модуль «Syntol- «SNP pig»», используйте его. Если такого модуля нет, нужно установить следующие значения Программы анализа: тип анализа – «Фрагментный», модуль управления – «FA_450», набор красителей – «GP Spectrum6A».
- Установить следующие параметры электрофореза во вкладках «Основные» и «Дополнительные» в соответствии со скриншотами ниже и табличными значениями (см.п 7.3):

Основные Дополнительные		
	Значение	Диапазон
Напряжение ввода пробы [В]	1200	от 1000 до 15000
✎ Время ввода пробы [сек]	20	от 1 до 360

Основные Дополнительные		
Внимание! Изменение данных настроек может привести к некорректным данным. Крайне не рекомендуется изменять данные настройки.		
	Значение	Диапазон
► Температура первого термостата [оC]	60	от 30 до 60
Температура второго термостата [оC]	60	от 30 до 60
Напряжение префореза [В]	15000	от 1000 до 15000
Время префореза [сек]	180	от 1 до 360
Напряжение электрофореза [В]	12200	от 1000 до 15000
Время электрофореза [сек]	1470	от 1 до 25200
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	500	от 0 до 4000
Длит. шага высокого при форезе,[сек]	15	от 1 до 60
Напр. шага высокого при форезе, [В]	1000	от 100 до 15000
Скорость шприца при подготовке к префорезу,[Шаг/сек]	4	от 1 до 4
Число шагов шприца при подг. к префорезу	800	от 1 до 10000
Число шагов после фореза	20	от 1 до 10000
=0 не включать термостат, =1 включать термостат	1	от 0 до 1
=0 не включать 2-й термостат, =1 включать 2-й термостат	1	от 0 до 1

- Чтобы сохранить установленный модуль для дальнейшего использования, нажмите на кнопку с фиолетовой дискетой. В графе «Имя файла» напишите «Syntol- «SNP pig» и нажмите «Сохранить». Будут сохранены параметры фореза. В дальнейшем для запуска прогона будет достаточно выбрать модуль управления.
- Нажать кнопку «Принять». Если у вас больше одного ряда, нужно выделить ячейки программ нужных вам рядов, кликнуть правой кнопкой мыши на ряде, принятом программой, и во всплывающем окне нажать «Применить к выделенным». Нажать кнопку запуска фореза.



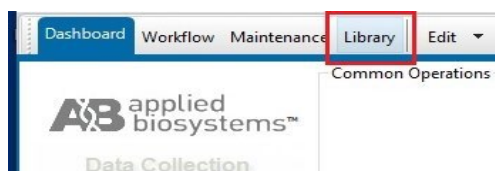
8. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА (AB3500/AB3500XL)

8.1. Проведение спектральной калибровки

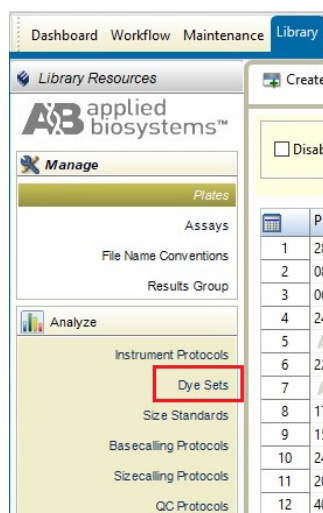
Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с калибратором «Spectrum6A».

8.1.1. Создание DyeSets

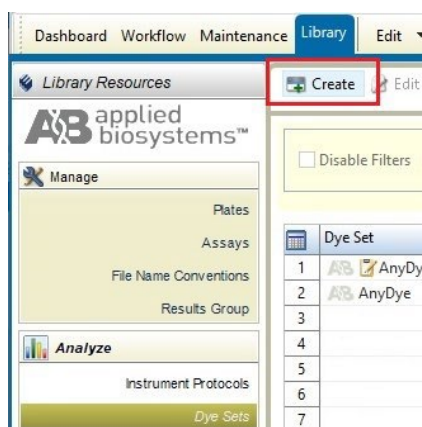
- Открыть программу Data Collection Software.
- Кликнуть по иконке «Library» в левом верхнем углу окна.



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



4. В верхней части нажать кнопку «Create».



5. В открывшемся окне в поле «Dye Set Name» написать «GpSpectrum6A», 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

Примечание - Время электрофореза «Limit Scans To» зависит от длины капилляров и типа полимера.

7. Нажать кнопку «Save» для сохранения Dye Set «GP Spectrum6A».

8.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

В отдельной пробирке смешать Ди-формамид и раствор «Spectrum6A» по протоколу:

	AB3500	AB3500XL
Ди-формамид	80 мкл	240 мкл
«GP Spectrum6A»	8 мкл	24 мкл

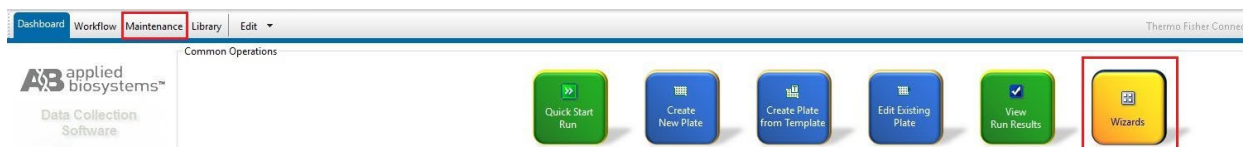
1. Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
2. Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки.

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.

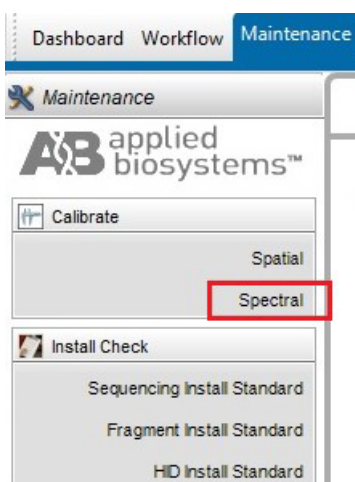
3. Установить 96-луночный планшет или стрипованные пробирки с раствором калибратора «Spectrum6A» в прибор для капиллярного электрофореза.

8.1.3. Запуск спектральной калибровки

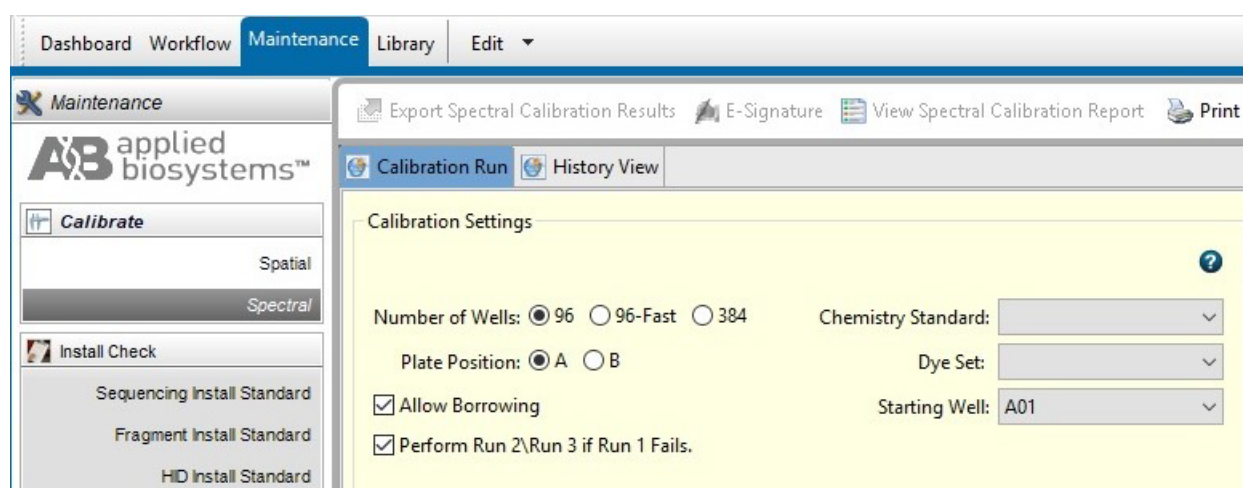
1. Открыть программу Data Collection Software. Кликнуть по кнопке «Maintenance» в верхней строке или «Wizard».



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



3. 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 «GP Spectrum6A», а в поле «Starting Well» указать номер первого стрипа в планшете, который содержит смесь калибратора.



4. Нажать на кнопку «Start Run» для запуска спектральной калибровки.
5. После завершения калибровки нажать кнопку «Ассерпт» в нижней части окна.

8.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

1. Приготовить смесь Ди-формаида и размерного стандарта СД-340 в следующем

соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Ди-формамид	10
Стандарт длины СД-340	1

Примечание - При расчете объемов компонентов смеси, необходимых на весь анализ, следует учесть, что как минимум две лунки плашки/стрипа при анализе каждой серии образцов должны содержать ПКО-wt и ПКО-mt.

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°C.

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

8.3. Запуск фрагментного анализа

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

Параметры	Рекомендуемое значение
Injection Voltage, [kVolts]	1,2
Injection Time, [sec.]	20
Run Voltage, [kVolts]	12.2

Время электрофореза – «Run Time» и время исключения регистрации электрофореза – «Data Delay» зависят от типа полимера и длины капилляров и настраиваются пользователем в зависимости от используемой комбинации капилляров и полимера.

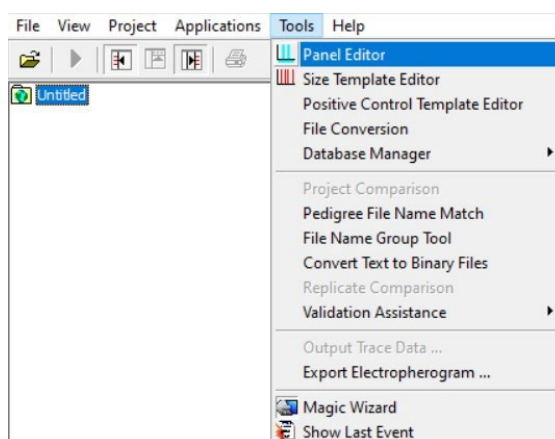
9. АНАЛИЗ ДАННЫХ

9.1. Анализ данных в программах GeneMarker и GeneMarker HID

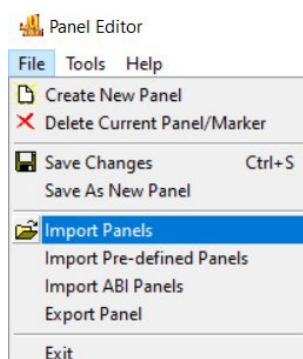
9.1.1. Импорт файлов для анализа данных

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

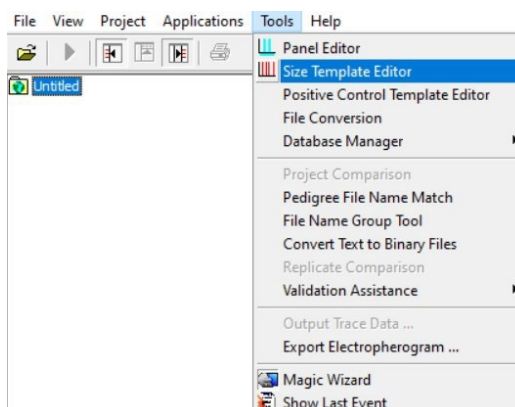
1. Запустить программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в выпавшем списке «**Panel Editor**».



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



3. Выбрать папку с файлом панели (**SNP pig**) 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».



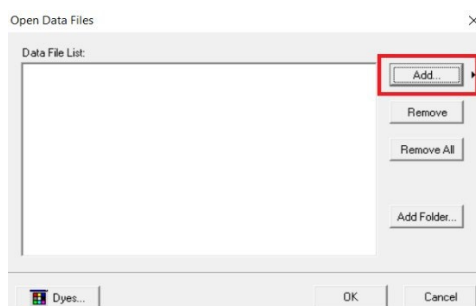
7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (СД-340) и подгрузить его в программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**.
8. Закрыть окно «Size Template Editor».

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».



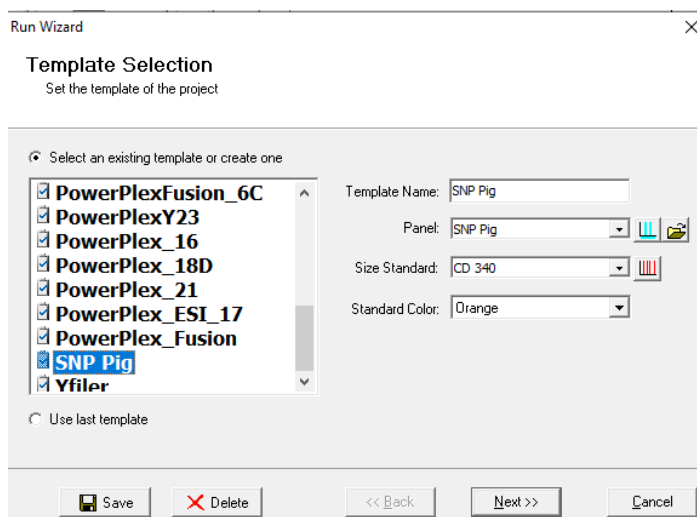
2. Нажать «Add» и загрузить нужные файлы.



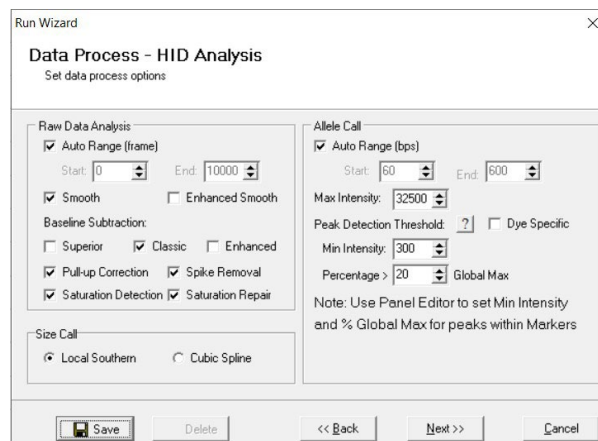
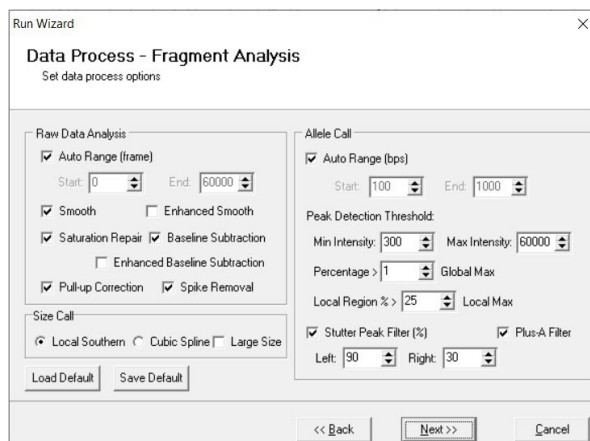
3. После добавления файлов нажать «OK».
4. Кликнуть по «Run» в окне «Run». Или запустить анализ, нажав на клавишу «Run Project» в верхнем меню.



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 «**SNP pig**», в графе «**Size Standard**» выбрать размерный стандарт «**СД-340**», указать цвет краски размерного стандарта и дать новое имя шаблону, например «**SNP Pig**». Нажать «**Next**».



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



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.

Run Wizard

Additional Settings - Fragment Analysis
Set additional options related to the different analysis type

Allelic Ladder:

Positive Control Template:

Allele Evaluation
Peak Score:
Reject < Check < Pass

☐ AFLP - Unconfidence at Rightside: Score <

<< Back Ok Cancel

Run Wizard

Additional Settings - HID Analysis
Set additional options related to the different analysis type

Allelic Ladder:

P.C. Template 1:

P.C. Template 2:

Allele Evaluation
Peak Score:
Reject < Check < Pass

☐ Mixture Evaluation
Valid Mixture Peak Percentage: %
Min Mixture Marker Number:

☒ Auto Select Best Ladder
Allow Match # Variance:
Max Average Size Diff:
☐ Use Ladder Library
Min Heterozygosity:

☒ Auto Panel Adjustment

☐ Sample Quality Sensor
'Q' Allele:
'S' Allele:

Save Delete << Back Ok Cancel

8. В открывшемся первом окне «**Run Wizard**» еще раз проверить все настройки и нажать «**Save**». Теперь в списке шаблонов появился новый шаблон анализа для работы с набором «**Pig Screen**» 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 во всех образцах правильно подписан размерный стандарт. Для этого нужно нажать на кнопку «**Size Calibration**» в верхней панели.



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.

Calibration Charts

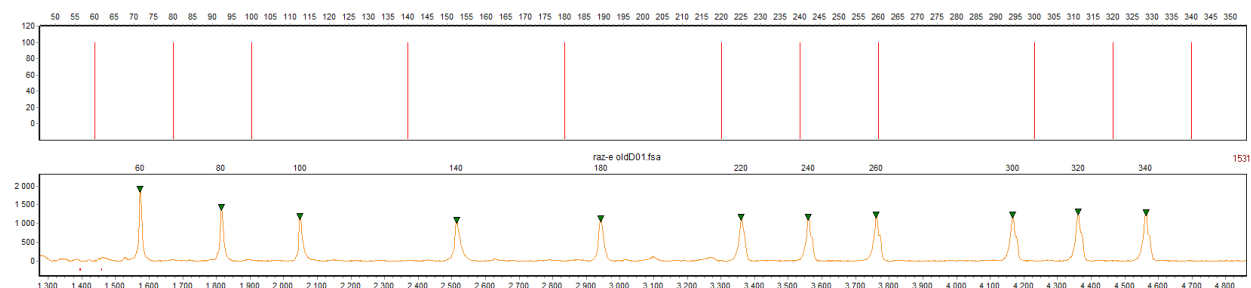
No.	Sample Name	Score
1	KPC_POS_A4.fsa	98
2	KPC_POS_B4.fsa	98
3	KPC_POS_C4.fsa	98
4	KPC_POS_D4.fsa	98
5	KPC_POS_E4.fsa	98
6	KPC_POS_F4.fsa	98
7	KPC_POS_G4.fsa	98
8	KPC_POS_H4.fsa	98

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

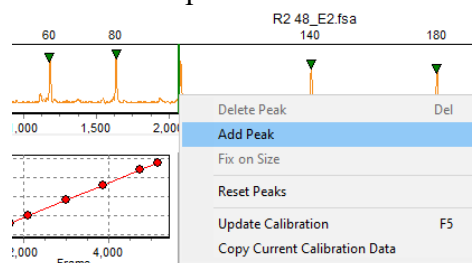
Calibration Charts

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

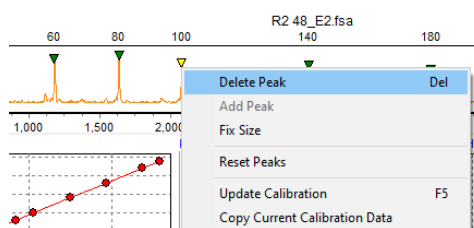
- Верхний график – это виртуальный размерный стандарт, построенный программой для проверки, на него нужно ориентироваться визуально. График ниже – размерный стандарт выбранного образца. Нужно убедиться, что паттерн подписанных пиков нижнего графика совпадает с паттерном пиков верхнего графика. Подписанные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



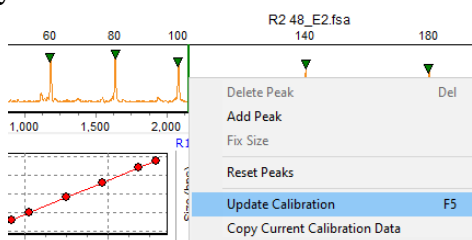
- Если на каких-то пиках треугольников не хватает, нужно их проставить, нажав правой кнопкой мыши на нужный пик и выбрав в выпавшем меню «Add Peak». Для удобства график можно масштабировать.



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



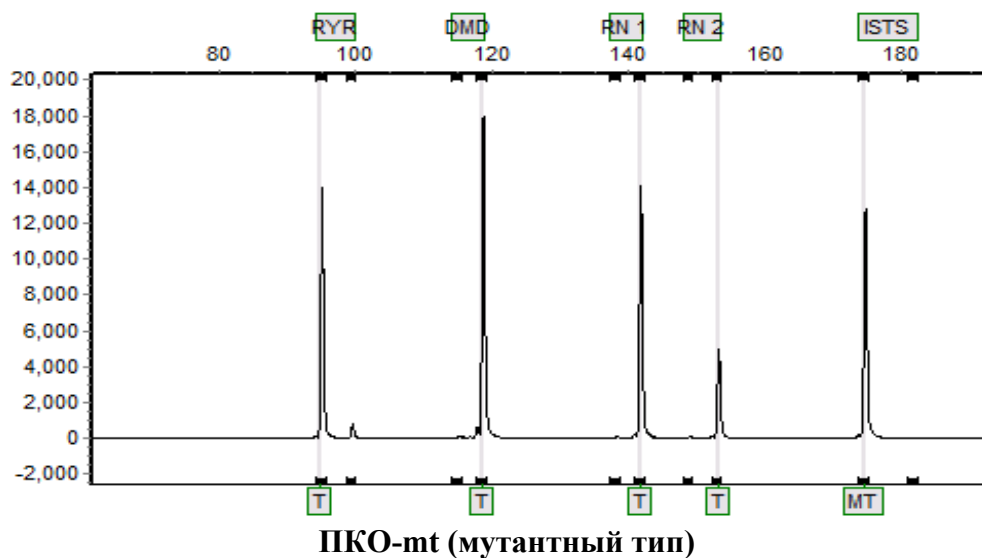
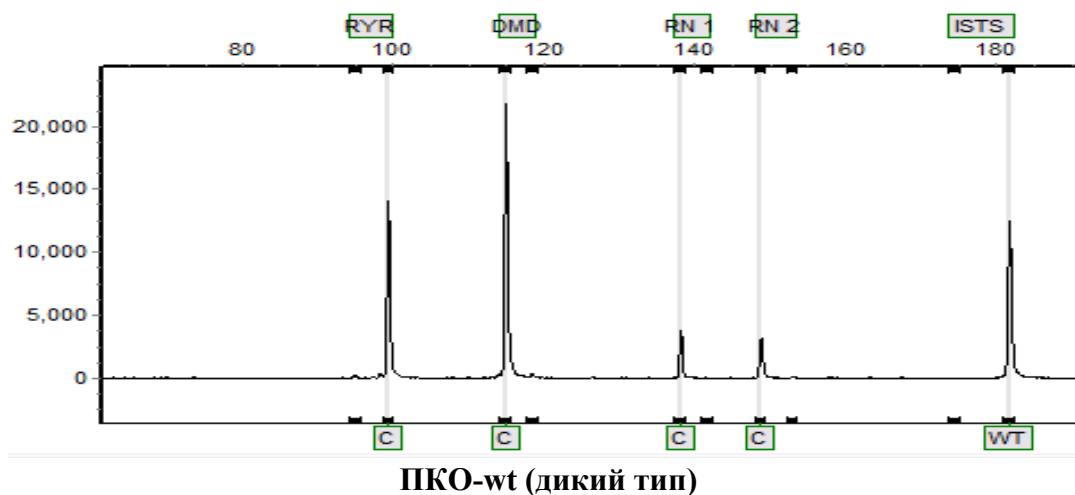
- По окончании корректировки пиков стандарта выбранного образца нужно правой кнопкой мыши нажать на свободное поле между пиками и в выпадающем меню выбрать «Update Calibration». Повторить процедуру для всех образцов, качество размерного стандарта которых ниже 96 баллов. Закрыть окно «Calibration Charts»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



9.1.4. Анализ положительных контрольных образцов (ПКО-wt и ПКО-mt)

- Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с ПКО-wt и ПКО-mt.
- В верхнем меню выбрать канал «Yellow», используя клавишу «Show Dye».

- Убедиться, что всем пикам **ПКО-wt** и **ПКО-mt** 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. Правой кнопкой мыши нажать на пустое поле графика, без пиков, и в выпавшем меню выбрать «**Confirm all**».

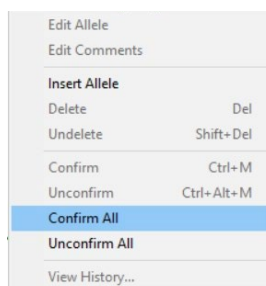
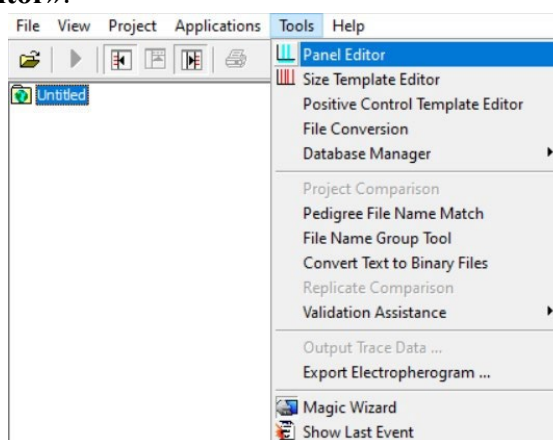


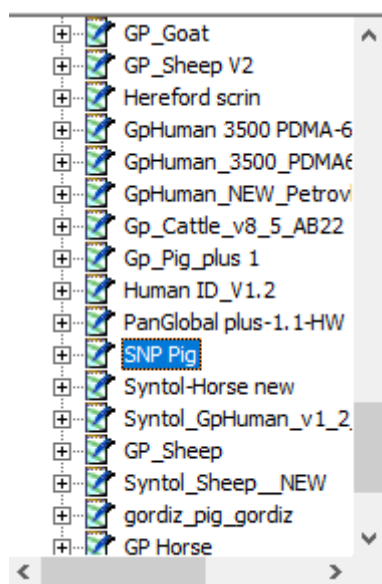
Таблица 4. Аллельное состояние положительных контрольных образцов (ПКО-wt и ПКО-mt)

Канал детекции	Заболевание	Аллельное состояние	
		ПКО-wt (дикий тип)	ПКО-mt (мутантный тип)
Yellow	RYR-синдром	C	T
	DMD-стресс-синдром	C	T
	RN1-синдром	C	T
	RN2-синдром	C	T
	ISTS-синдром	WT	MT

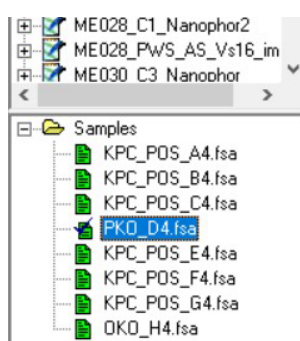
5. Если присвоенные значения аллелей не соответствуют значениям в таблице 4, необходимо настроить панель.
6. Для настройки панели необходимо в верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor».



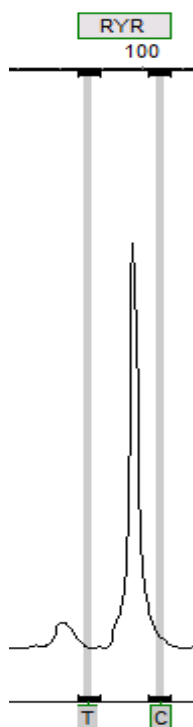
7. В списке панелей слева выбрать панель для редактирования.



8. В списке образцов ниже выбрать только положительные контроли (ПКО-wt и ПКО-mt). С лишних образцов снять галочки выделения, нажав дважды левой кнопкой мыши.



9. 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 на название маркера на полосе сверху и мышью передвинуть маркер в нужное положение. В окне панели возможно такое же масштабирование, как и на графиках образцов в основном рабочем окне.



10. 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**».
11. Далее нужно закрыть окно «**Panel Editor**» и заново перезапустить анализ проекта, в стандартном шаблоне выбрав отредактированную панель вместо обычной.

9.1.5. 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.

9.1.6. Анализ образцов

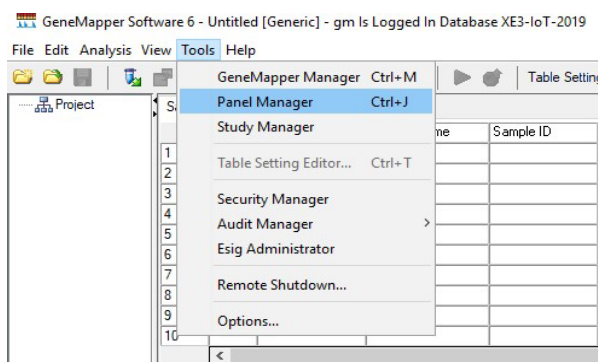
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу образца.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал, используя клавишу «**Show Dye**».
3. Убедиться, что всем пикам присвоено значение аллеля.

9.2. Анализ данных в Gene Mapper

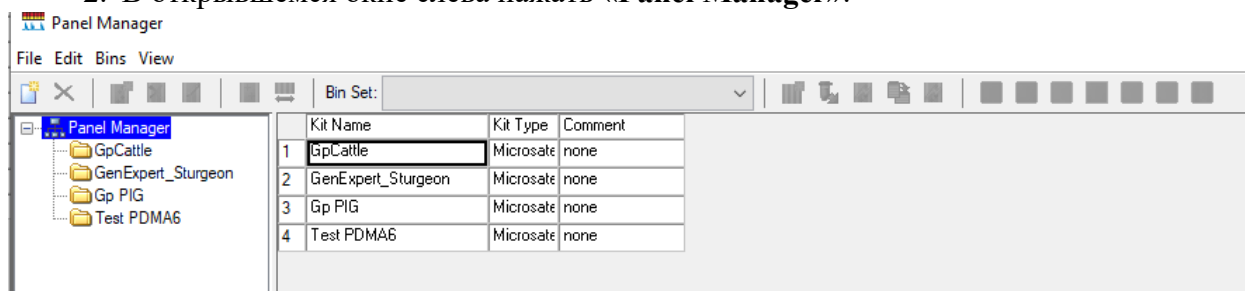
9.2.1. Импорт файлов для анализа данных

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

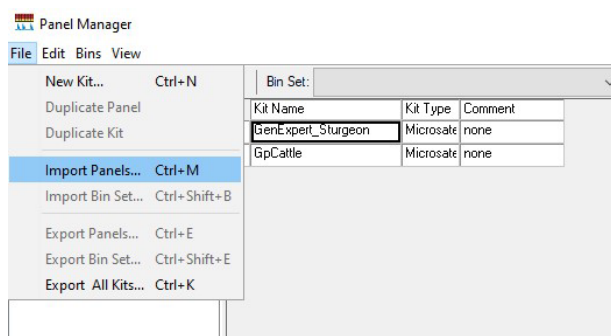
1. Запустить программу **GeneMapper Software 6**, в верхнем меню нажать «**Tools**», в выпавшем списке выбрать «**Panel Manager**».



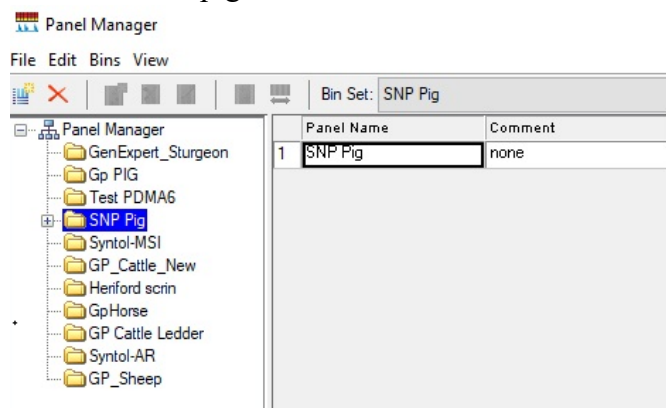
2. В открывшемся окне слева нажать «**Panel Manager**».



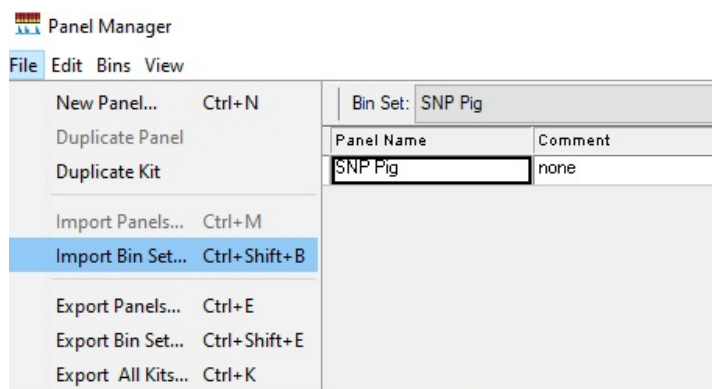
3. В верхнем меню нажать «**File**», в выпавшем списке выбрать пункт «**Import Panels**».



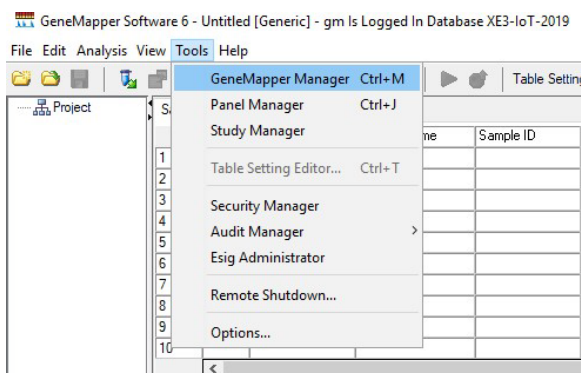
4. Выбрать папку с файлом панели (SNP pig) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».
5. Щелкнуть по папке SNP pig, появившейся в списке «**Panel Manager**».



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



7. Выбрать папку с файлом бинов (SNP pig) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Заккрыть 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**».

GeneMapper Manager

Projects	Analysis Methods	Table Settings	Plot Settings	Cluster Plot Settings	Matrices	Size Standards	SNF
Name	Size Standard Dye	Last Saved	Owner				
S550 Gordis	Orange	2024-04-27 16:29:47.0	gm				
SD 300	Orange	2025-01-10 15:38:28.0	gm				
sd-450	Orange	2022-01-28 14:39:17.0	gm				
CD-240	Orange	2022-01-18 13:14:13.0	gm				
SD 340	Orange	2025-01-10 15:38:17.0	gm				
cd 240 new	Orange	2024-08-13 13:14:06.0	gm				
520olya	Orange	2024-08-02 21:48:23.0	gm				
cd420	Orange	2022-03-25 12:17:27.0	gm				
cd400	Red	2022-03-25 12:09:01.0	gm				
SNPlex_48plex_v1	Orange	2003-09-26 22:16:34.0	gm				
GS600LIZ	Orange	2008-06-27 22:03:44.0	gm				
GS600LIZ+Normalization	Orange	2008-06-27 21:59:54.0	gm				
GS500ROX	Red	2008-04-18 01:58:46.0	gm				
GS500(-35,-250,-340)ROX	Red	2008-06-12 04:04:14.0	gm				
GS500(-35,-250,-340)LIZ	Orange	2008-04-18 01:59:07.0	gm				
GS500(-250)ROX	Red	2008-04-18 01:56:15.0	gm				
GS500(-250)LIZ	Orange	2002-08-21 00:02:36.0	gm				
GS400HDX	Red	2002-08-21 00:02:36.0	gm				
GS350ROX	Red	2002-06-11 01:26:47.0	gm				
GS120LIZ	Orange	2002-08-21 00:02:36.0	gm				
GS1200LIZ	Orange	2008-08-12 03:39:54.0	gm				

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**».

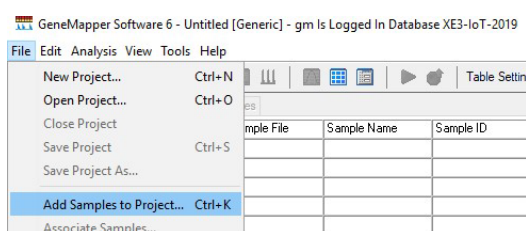
GeneMapper Manager

Projects	Analysis Methods	Table Settings	Plot Settings	Cluster Plot Settings	Matrices
	Name	Last Saved		Owner	
	Gp PIG	2023-07-20 10:49:16.0		gm	
	Tast PDMA6	2022-05-24 14:29:07.0		gm	
	GenExpert Sturgeon	2022-02-24 15:34:37.0		gm	
	SNPlex_Rules_3730	2004-09-21 22:39:02.0		gm	
	SNPlex_Rules_3130	2008-04-18 01:59:07.0		gm	
	SNPlex_Model_3730	2004-09-21 22:38:48.0		gm	
	SNAPshot Default	2003-07-26 05:10:08.0		gm	
	Microsatellite Default	2005-06-09 00:50:00.0		gm	
	AFLP Default	2004-07-17 03:21:19.0		gm	
	SNP Pig	2025-12-15 11:20:28.0		gm	
	Gene Profile Horse	2025-03-07 16:56:34.0		gm	
	cat	2025-03-05 10:29:43.0		gm	
	Heriford	2024-10-10 16:55:54.0		gm	
	GpCattle	2022-02-09 15:11:24.0		gm	
	Syntol-AR	2024-03-26 12:19:56.0		gm	
	Syntol-MSI-methods	2024-07-18 18:45:40.0		gm	
	GP_Sheep_method	2024-04-24 18:32:58.0		gm	

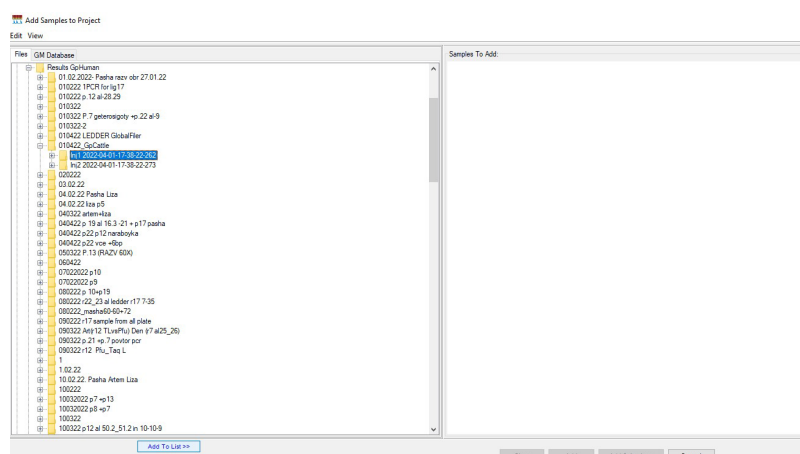
12. Выбрать папку с файлом метода (SNP pig _method) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «Import». Закрыть окно «GeneMapper Manager».

9.2.2. Анализ данных

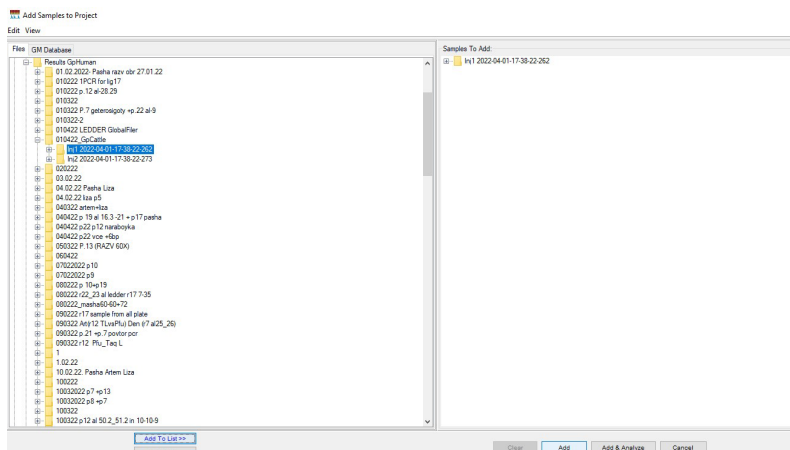
1. В программе **GeneMapper Software 6** в верхнем меню выбрать «File», в открывшемся списке выбрать «Add Samples to Project».



2. В открывшемся окне выбрать 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» – **SNP pig**, «Size Standard» – **CD-340**, «Analysis Method» – **SNP pig_method**.
5. Запустить анализ.

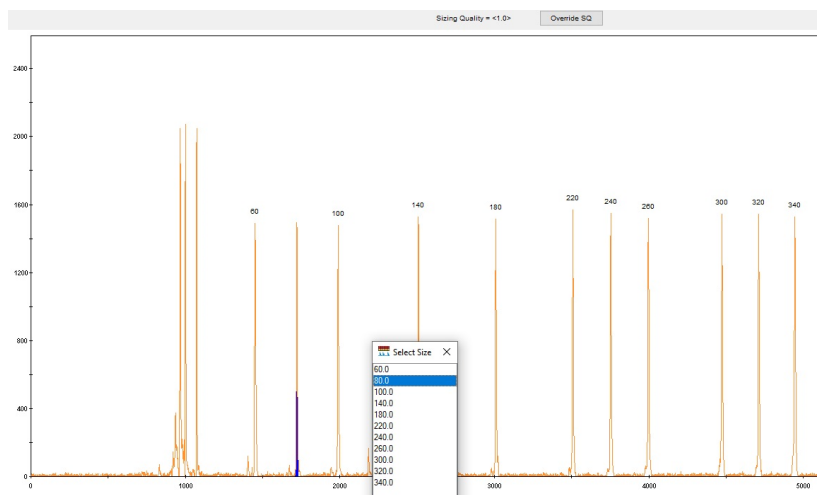
9.2.3. Анализ размерного стандарта

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

vWell	SE	SQO	ARNM	SFNF	MNF	SNF	SOS	SQ
A07								
B07								
C07								
D07								

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

2. В открывшемся окне из списка слева нужно поочередно выбирать образцы для проверки нажатием левой кнопки мыши. На графике справа будут отображаться их размерные стандарты.
3. Неправильно подписанный пик можно удалить или переименовать, нажав на него правой кнопкой мыши. Неподписанный пик необходимо подписать.

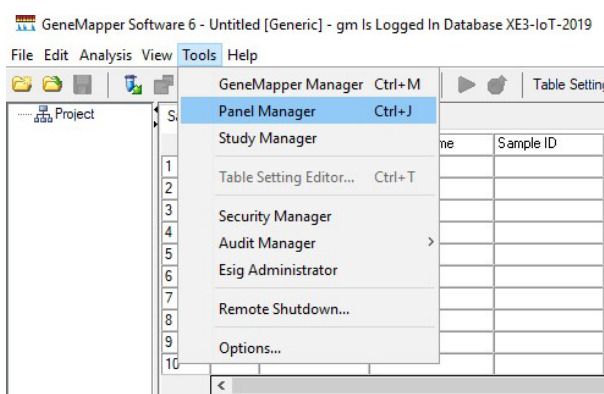


4. По окончании редактирования размерного стандарта нужно нажать кнопку внизу «Apply», затем «OK». После проверки и исправления всех образцов окно «Size

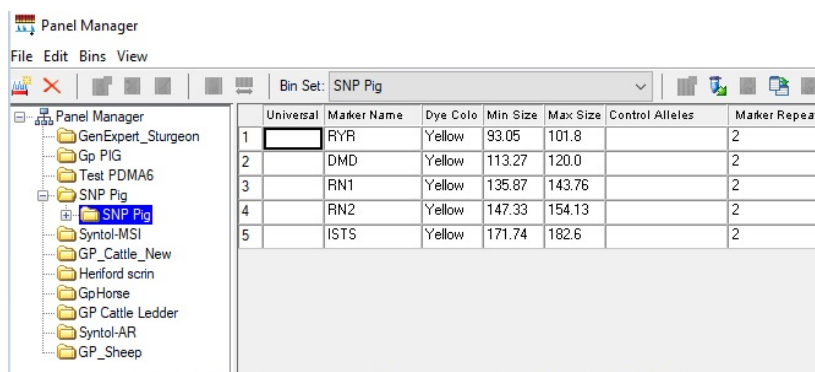
Match Editor» можно закрыть. Далее можно приступить к анализу **ПКО**.

9.2.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО-wt и ПКО-mt)

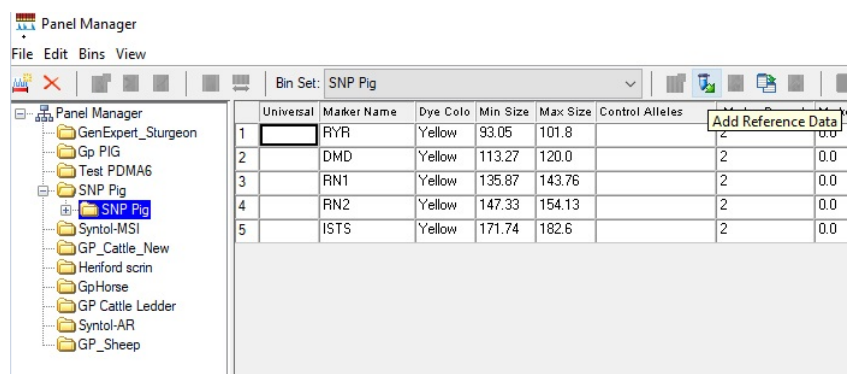
1. Открыть образец ПКО-wt и ПКО-mt. В верхнем меню отключить все каналы, кроме Yellow. Убедиться, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 4). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «**DELETE**».
2. Если присвоенные значения аллелей не соответствуют значениям в таблице, необходимо настроить панель.
3. Для настройки панели необходимо закрыть окно с образцом. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в открывшемся списке выбрать «**Panel Manager**».



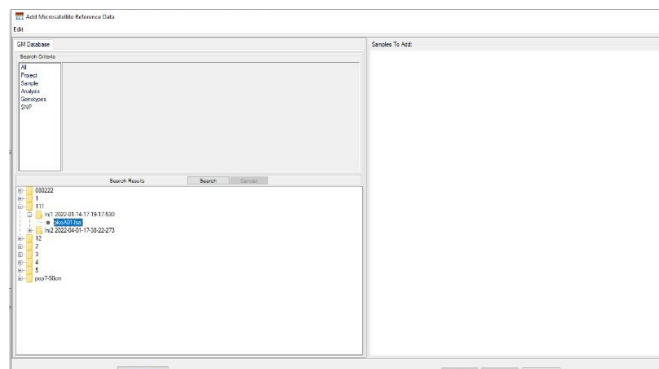
4. В открывшемся окне выбрать папку **SNP pig**. В результате отобразится список всех локусов.



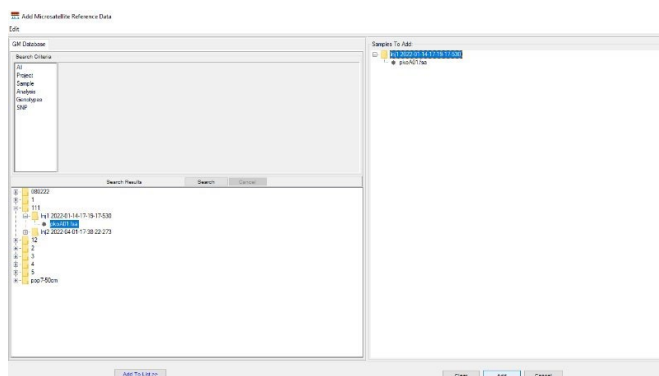
5. В верхнем меню нажать кнопку «**Add Reference Data**».



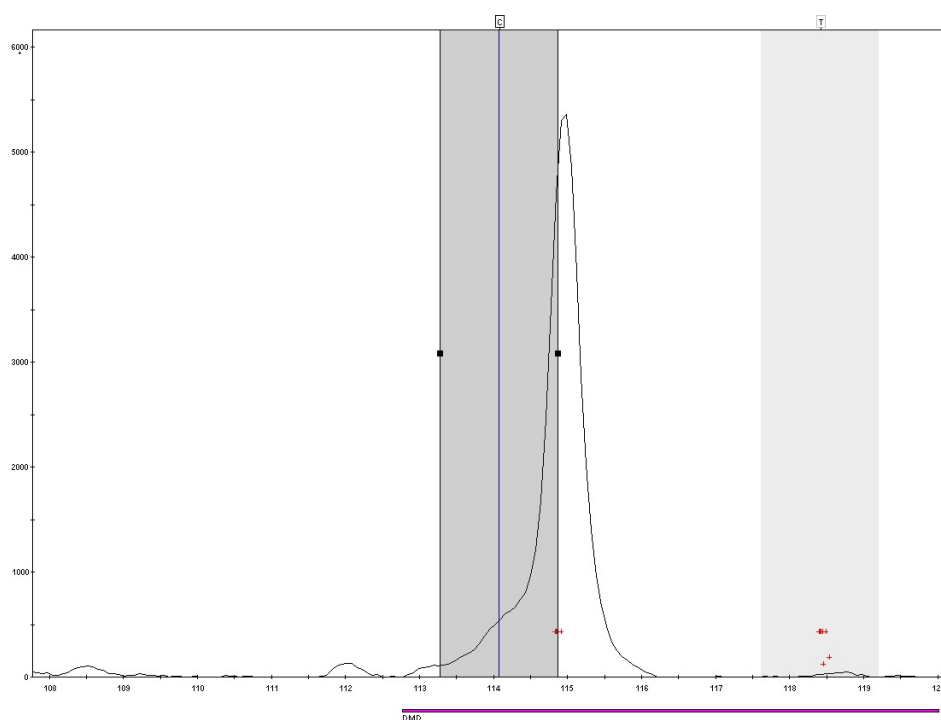
- В открывшемся окне внизу слева выбрать папку с данными постановки, в ней будет образец ПКО. Нажать «Add To List».



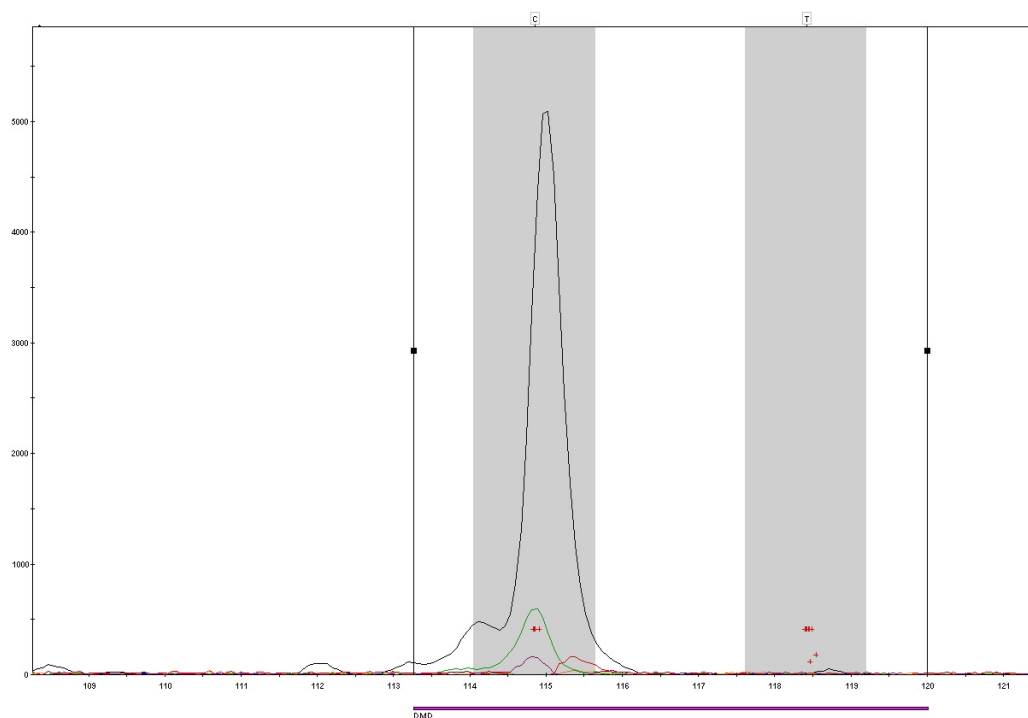
- Справа появятся выбранные папка и файл. Внизу справа нажать кнопку «Add».



- В предыдущем окне слева появятся выбранные референсные образцы. Выбрать из списка локус, который необходимо редактировать, внизу нажать на образец ПКО-wt и ПКО-mt.



9. В открывшемся окне отключить все каналы, кроме «Yellow». Внизу нажать на горизонтальную линию диапазона локуса для отображения границ локуса. Расширить границы локуса и сдвинуть бины локуса.



10. Проверить, что всем пикам ПКО были присвоены верные значения.
11. После настройки значений локуса нажать кнопку «Apply».
12. Повторить действия со всеми локусами, которым были неверно присвоены аллельные состояния.
13. Нажать кнопку «ОК».

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 значение аллеля.

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

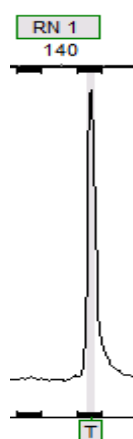
Аллельный статус исследуемого образца оценивается по каждому локусу отдельно.

В пределах одного локуса возможно два варианта аллельного состояния:

- гомозиготный – один пик в локусе (животное с мутацией или без)
- гетерозиготный – два пика в локусе (животное - носитель мутантного гена).



Гомозиготный генотип по локусу RN1-синдром - здоровое животное



Гомозиготный генотип по локусу RN1-синдром – больное животное



Гетерозиготный генотип по локусу RN1-синдром – животное-носитель мутантного гена

12. 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.

ВАЖНО! При удалении пробирок, содержащих продукты амплификации, недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

13. 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.

14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

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