

# **CO***r***DIS Plus**



## **Инструкция пользователя**

**генетического анализатора  
НАНОФОР 05**

# COrDIS Plus

## Набор реагентов для мультиплексного анализа 19-ти STR-маркеров и локуса амелогенина человека

### Содержание

1.	ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ _____	2
1.1	Описание продукта _____	2
1.2	Информация для заказа набора COrDIS Plus и его компонентов _____	5
1.3	Компоненты набора и состав (на примере кат. ном. CP-192S) _____	5
1.4	Необходимые компоненты, не входящие в набор COrDIS Plus _____	6
1.5	Условия хранения _____	7
1.6	Основные характеристики набора _____	8
1.7	Гарантии качества _____	8
2.	РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ _____	9
2.1	Контрольная ДНК _____	9
2.2	Размерный стандарт S550 _____	9
2.3	Аллельная лестница _____	9
2.4	Спектральный калибратор CS5 _____	10
3.	ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ _____	11
3.1	Постановка реакции _____	11
3.2	Условия амплификации _____	12
4.	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05 _____	15
4.1	Проведение спектральной калибровки _____	15
4.2	Проведение капиллярного электрофореза _____	24
4.2.1	Подготовка и загрузка продуктов амплификации _____	24
4.2.2	Запуск фрагментного анализа _____	25
5.	АНАЛИЗ ДАННЫХ _____	33
5.1	Запуск анализа _____	33
5.2	Создание схемы анализа _____	37
5.3	Создание стандарта длины _____	40
5.4	Стандарт длины S550 _____	42
5.5	Интерпретация результатов анализа _____	42
5.6	Диапазоны размеров аллелей STR маркеров _____	50
6.	ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ _____	51

## 1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

### 1.1 Описание продукта

COrDIS Plus – мультиплексный набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 19 локусов, содержащих короткие tandemные повторы (STR-локусы) и локуса гена амелогенина в геномной ДНК человека. Набор предназначен для идентификации личности и определения биологического родства, аутентификации клеточных линий, анализа биологического химеризма после трансплантации органов и тканей человека. В состав набора COrDIS Plus включены STR-маркеры одновременно из двух систем международных стандартов молекулярно-генетической идентификации человека: американской CODIS и европейской ESS. Это позволяет добиться исключительно высокой информативности исследования и совместимости полученных результатов с любыми существующими экспертно-криминалистическими базами данных. Из 19 анализируемых STR-локусов 13 составляют стандартную панель CODIS (системы комбинированного индекса ДНК: D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, и VWA), 5 локусов рекомендованы ENFSI (Европейской Сетью Институтов Криминалистики) для расширения европейских национальных баз данных (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 и D22S1045) и локус SE33 — наиболее полиморфный из известных STR-маркеров. Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 20 локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов <420 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с детектированием сигнала флуоресценции, индуцированного лазером. В наборе используется пять флуоресцентных красителей, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременного детектирования в разных каналах флуоресценции. Праймеры содержат четыре флуоресцентных красителя, детектируемых в каналах FAM, R6G, TAMRA, ROX. Стандарт длины S550 мечен пятым флуоресцентным красителем и детектируется в канале LIZ одновременно с продуктами ПЦР.

Для получения полного STR-профиля образца достаточно 0,2 нанограмма (нг) недеградированной ДНК. Оптимальное количество — 1 нг.

Реакционные смеси в наборе находятся в пробирках объемом 0,2 мл, объединенных в стрипы из восьми пробирок и поставляются в высушенном

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

Набор CoRDIS Plus может использоваться для создания национальных криминалистических баз данных в странах, использующих в качестве стандартной панели локусов маркеры CODIS (Combined DNA Index System), а также Европейских баз данных на основе ESS (European Standard Set), включая страны, использующие SE33 как обязательный маркер. Благодаря высочайшему дискриминирующему потенциалу, CoRDIS Plus прекрасно подходит для ДНК-идентификации личности, анализа родства (например, экспертизы спорного отцовства), анализа химеризма после пересадки костного мозга, а также для идентификации клеточных линий.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах: АНК-32/48 (ООО НПФ «Синтол», Россия), GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, MJ Research PTC-100, BioRAD MyCycler, Biometra TPersonal, Eppendorf Mastercycler. Анализ ПЦР-продуктов проводится с использованием генетического анализатора НАНОФОР 05 (ООО «НПФ Синтол», Россия).

Сводная информация о STR-локусах набора CoRDIS Plus представлена в таблице 1. Структура единицы повтора приводится в соответствии с рекомендациями Международного Общества Судебных Генетиков (International Society for Forensic Genetics – ISFG) [Bär et al, 1997]. Лocus амелогенина не является STR-маркером, однако продукты амплификации этого локуса для хромосом X и Y различаются по длине.

Таблица 1. Описание STR-локусов CO<sub>r</sub>DIS Plus.

Маркер	Реф. Номер GenBank®	Реф. аллель GenBank®	Хромосомная локализация	Структура единицы повтора реф. аллеля
D1S1656	NC_000001.9	17	1q42	[TAGA] <sub>16</sub> [TGA][TAGA][TAGG] <sub>1</sub> [TG] <sub>5</sub>
D2S441	AL079112	12	2p14	[TCTA] <sub>12</sub>
D3S1358	NT_005997	18	3p21.31	TCTA [TCTG] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>15</sub>
D5S818	AC008512	11	5q23.2	[AGAT] <sub>11</sub>
D7S820	AC004848	13	7q21.11	[GATA] <sub>13</sub>
D8S1179	AF216671	13	8q24.13	[TCTA] <sub>3</sub>
D10S1248	AL391869	13	10q26.3	[GGAA] <sub>13</sub>
D12S391	G08921	19.3	12p13.2	[AGAT] <sub>5</sub> GAT[AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT
D13S317	AL353628	11	13q31.1	[TATC] <sub>11</sub>
D16S539	AC024591	11	16q24.1	[GATA] <sub>11</sub>
D18S51	AP001534	18	18q21.33	[AGAA] <sub>18</sub>
D21S11	AP000433	29	21q21.1	[TCTA] <sub>4</sub> [TCTG] <sub>6</sub> [TCTA] <sub>3</sub> TA[TCTA] <sub>3</sub> TCA [TCTA] <sub>2</sub> TCCATA [TCTA] <sub>11</sub>
D22S1045	AL022314	17	22q12.3	[ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub>
CSF1PO	X14720	12	5q33.1	[AGAT] <sub>12</sub>
FGA	M64982	21	4q31.3	[TTTC] <sub>3</sub> TTTTTTCT[CTTT] <sub>13</sub> CTCC[TTCC] <sub>2</sub>
SE33	V00481	26.2	6q14	[AAAG] <sub>8</sub> AA [AAAG] <sub>17</sub>
TH01	D00269	9	11p15.5	[TCAT] <sub>9</sub>
TPOX	M68651	11	2p25.3	[AATG] <sub>11</sub>
VWA	M25858	18	12p13.31	TCTA [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>13</sub>
Амелогенин	X M55418	X	Xp22.1–22.3	
Амелогенин	Y M55419	Y	Yp11.2	

## 1.2 Информация для заказа набора CO<sub>r</sub>DIS Plus и его компонентов

Набор CO<sub>r</sub>DIS Plus может поставляться в пробирках, объединенных по 8 штук в стрипы с отдельно прикрепленными крышками, либо в 96-луночных планшетах:

- Стрипы 8 x 0,2 мкл, пробирки с отдельно прикрепленными крышками

Название	Реакций в наборе	Каталожный номер
CO <sub>r</sub> DIS Plus	24 x 8 пробирок (192 реакций x 25 мкл)	CP-192S

## 1.3 Компоненты набора и состав (на примере кат. ном. CP-192S)

1.	Стрипы с реакционными смесями 8 x 0,2 мл	12 стрипов
2.	Раствор активатора (голубая крышка)	500 мкл
3.	Деионизованная вода (белая крышка)	1700 мкл
4.	Контрольная ДНК МК1 (лиоф., зеленая крышка)	1 пробирка (20 реакций)
5.	Стандарт длины S550, (лиоф., желтая крышка)	1 пробирка (120 нанесений)
6.	Аллельная лестница, (лиоф., красная крышка)	1 пробирка (20 нанесений)
7.	Планшет 96-луночный	1 шт.

*Стрипы с реакционными смесями* представляют собой реакционные пробирки объемом 0,2 мл, объединенные в стрипы по 8 шт. и предназначены для проведения в них полимеразной цепной реакции. На дне пробирок содержатся все необходимые компоненты ПЦР включая Taq-полимеразу, смесь дНТФ, реакционный буфер, праймерную смесь в сухом виде. Благодаря флуоресцентно-меченым праймерам, сухая реакционная смесь на дне пробирок имеет розовый цвет.

*Раствор активатора* используется для разведения лиофилизированной реакционной смеси. Содержит буферный раствор и ионы магния Mg<sup>2+</sup> в качестве активатора ПЦР.

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

*Контрольная ДНК МК1* представляет собой 20 нг высокомолекулярной геномной ДНК мужчины с известным генотипом по всем исследуемым локусам (рисунок 5, стр. 47). Предназначена для контроля этапов

амплификации, электрофореза и анализа данных. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует разведения водой ([пункт 2.1](#)).

*Стандарт длины S550* представляет собой лиофилизированную смесь флуоресцентно-меченных спектральным аналогом LIZ фрагментов ДНК разной длины. Стандарт длины S550 содержит следующие 24 фрагмента ДНК (п.н.): 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450, 500 и 550 (рисунок 2, стр. 42). Стандарт S550 используется на этапе капиллярного электрофореза, вносится в каждый капилляр одновременно с исследуемым образцом и служит размерным стандартом для построения кривой подвижности амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Благодаря высокой плотности фрагментов стандарта S550 обеспечивается высокая точность и воспроизводимость определения длины амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Перед использованием требует разведения водой ([пункт 2.2](#)).

*Аллельная лестница* представляет собой лиофилизированную смесь из 243 флуоресцентно-меченных амплифицированных фрагментов ДНК (Рисунок 4, стр. 46), соответствующих всем аллельным вариантам исследуемых локусов, встречающимся с частотой более 1%. Аллельная лестница используется на этапе капиллярного электрофореза, анализируется параллельно с каждой серией образцов для идентификации аллельных вариантов исследуемых локусов. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует разведения водой ([пункт 2.3](#)). Аллельная лестница содержит ПЦР-продукты и при несоблюдении мер предосторожности может быть источником контаминации остальных реагентов. Сразу после получения набора рекомендуется извлечь аллельную лестницу из общей упаковки и хранить отдельно от остальных компонентов в темноте в зоне для работы с ПЦР-продуктами.

#### 1.4 Необходимые компоненты, не входящие в набор CO<sub>r</sub>DIS Plus

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

Спектральный калибратор CS5

Можно заказать отдельно, поставляется ООО ГОРДИЗ (каталожный номер CS5).

Бины и панели для программы Фрагментный анализ ДНК (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург). Предоставляются ООО «ГОРДИЗ» бесплатно.

Бины и панели для GeneMapper™, макрос для Genotyper™  
Предоставляются ООО «ГОРДИЗ» бесплатно по запросу.

**Реагенты и вспомогательное оборудование, поставляемые  
другими фирмами:**

<b>Реагент</b>	<b>Производитель</b>	<b>Каталожный номер</b>
Буфер ТАПС	ЗАО «СИНТОЛ»	БТС-0025
Полимер ПДМА-6	ЗАО «СИНТОЛ»	ПД-0603
Деионизованный формамид	ЗАО «СИНТОЛ»	ДИ-ФА
<b>Оборудование</b>	<b>Производитель</b>	<b>Каталожный номер</b>
Центрифуга-вортекс	ООО «НПФ Синтол»	Циклотемп-901
Микроцентрифуга для стрипов	ООО «НПФ Синтол»	Циклотемп-903
Прибор для ПЦР/ПЦР-РВ	ООО «НПФ Синтол»	АНК-32/48
Центрифуга для плашек	Eppendorf	Centrifuge 5810 R

### 1.5 Условия хранения

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

Флуоресцентно меченные праймеры, размерный стандарт S550 и аллельная лестница чувствительны к воздействию света и должны храниться в темном месте. Пользователи могут хранить наборы при комнатной температуре до полугода без потери чувствительности.

Сразу после получения набора рекомендуется извлечь аллельную лестницу из общей упаковки и хранить отдельно от остальных компонентов в темноте в зоне для работы с ПЦР-продуктами.

Контрольная ДНК, аллельная лестница и размерный стандарт после разведения водой, должны храниться при температуре 2...8 °С в течение месяца. Для более длительного хранения рекомендуется заморозка при -20 °С.

## 1.6 Основные характеристики набора

- Количество одновременно анализируемых маркеров — 20.
- Список одновременно анализируемых локусов: D3S1358, TH01, D12S391, D1S1656, D10S1248, D22S1045, D2S441, D7S820, D13S317, FGA, TPOX, D18S51, D16S539, D8S1179, CSF1PO, D5S818, VWA, D21S11, SE33, Амелогенин.
- Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе — 5.
- Оптимальное количество вносимой ДНК: 1 нг.
- Предел чувствительности: <50 пг.
- Дискриминирующий потенциал набора: менее 1 из 10<sup>21</sup>.

## 1.7 Гарантии качества

Качество каждого компонента набора проверено и контролируется в процессе производства. Каждый выпущенный лот лиофилизованных реагентов регулярно проверяется на соответствие заявленным характеристикам в течение 18 месяцев. В случае возникновения вопросов относительно качества набора CO<sub>r</sub>DIS Plus, просим незамедлительно связаться с ООО «ГОРДИЗ». Контактная информация указана в [главе 6](#).

## 2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ

### 2.1 Контрольная ДНК

Добавить 20 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором, в пробирку с сухой контрольной ДНК (пробирка с зеленой крышкой). Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. После разведения контрольную ДНК необходимо хранить при температуре 2...8 °С в течение месяца. Для более длительного хранения рекомендуется хранить в замороженном виде. Следует избегать многократного размораживания. Для проведения ПЦР необходимо добавить 1 мкл контрольной ДНК в реакционную пробирку. Данный объем будет соответствовать 1 нг геномной ДНК.

### 2.2 Размерный стандарт S550

Перед использованием добавить 120 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором, в пробирку с сухим размерным стандартом S550 (пробирка с желтой крышкой). Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. После разведения размерный стандарт необходимо хранить при температуре 2...8 °С в течение месяца. Для более длительного хранения рекомендуется хранить в замороженном виде. Следует избегать многократного размораживания. Для проведения капиллярного электрофореза добавить 1 мкл стандарта S550 в каждую лунку планшета, содержащую формамид и ПЦР продукт.

### 2.3 Аллельная лестница

Сразу после получения набора, пробирку с аллельной лестницей необходимо извлечь из коробки и хранить отдельно в зоне для работы с ПЦР-продуктами в темном месте. Для получения рабочего раствора добавить в пробирку с сухой аллельной лестницей (красная крышка) 20 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки центрифугированием в течение нескольких секунд. После разведения аллельную лестницу необходимо хранить в темноте при температуре 2...8 °С. Для длительного хранения (более 3 месяцев) рекомендуется хранить раствор в замороженном виде. Следует избегать многократной разморозки. Для проведения капиллярного электрофореза необходимо добавить 1 мкл аллельной лестницы в смесь формамида и размерного стандарта ([пункт 4.3](#)).

## 2.4 Спектральный калибратор CS5

Перед использованием добавить в пробирку (пробирка с сиреневой крышкой) 20 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором, и инкубировать при комнатной температуре 2 мин. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. После разведения спектральный калибратор необходимо хранить при температуре 2...8 °С в течение 2 недель. Для более длительного хранения рекомендуется хранить в замороженном виде. Следует избегать повторного размораживания.

Проведение спектральной калибровки описано в [пункте 4.1](#).

### 3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

#### 3.1 Постановка реакции

В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Активатора. Затем внести до 20 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0,2–2 нг. Оптимальное количество вносимой ДНК — 1 нг. Вносимый объем ДНК зависит от ее концентрации. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет **20 мкл**. При необходимости довести общий объем реакции до 25 мкл деионизированной водой, поставляемой в составе набора.

Компоненты набора	Объем на 1 реакцию
Раствор активатора	5 мкл
Геномная ДНК (0,2–2 нг)	до 20 мкл
Деионизированная вода, до конечного объема	25 мкл

Необходимо учитывать, что в некоторых случаях при добавлении ДНК в объеме более 10 мкл возможно внесение избытка ингибирующих веществ в реакцию, что может приводить к снижению чувствительности. Тем не менее, набор CO<sub>r</sub>DIS Plus обладает высокой устойчивостью к ингибиторам и, как правило, большие объемы раствора ДНК не вызывают трудностей. При разведении геномной ДНК водой важно помнить, что в деионизированной воде происходит постоянный гидролиз ДНК. Для длительного хранения рекомендуется разведение ДНК в буферах (pH > 7), содержащих небольшое количество ЭДТА (например, TE с 0,1 мМ ЭДТА). Высокая концентрация ЭДТА в растворе ДНК может быть причиной снижения эффективности реакции вследствие хелатирования ионов магния.

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

С каждой серией исследуемых образцов **необходимо** амплифицировать один **положительный контроль** (1 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (деионизированная вода вместо ДНК).

### 3.2 Условия амплификации

Приведенные ниже условия амплификации рекомендуются **в качестве стандартных параметров**. Важно соблюдение скорости нагрева **0,3 °C/с.** на этапе повышения температуры с 59 °C до 72 °C. В связи с высокой сложностью амплификации с участием 20 пар праймеров, **данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции.**

Стандартные параметры ПЦР:

---

94 °C	3 мин	
98 °C	30 с	
59 °C*	120 с	4 цикла
72 °C	90 с	
94 °C	30 с	
59 °C*	120 с	6 циклов
72 °C	90 с	
90 °C	30 с	
59 °C	120 с	20 циклов
72 °C*	75 с	
68 °C	10 мин	
15 °C	∞	

---

\* Рекомендуемая скорость нагрева с 59 °C до 72 °C — не более 0,3 °C /с.

Ниже приводятся примеры программ, подобранных для приборов АНК 32/48 и GeneAmp9700.

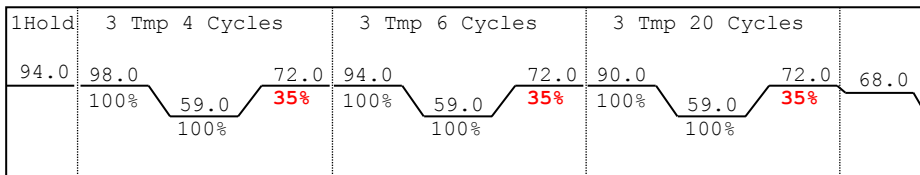
- Рекомендуемые параметры ПЦР для приборов АНК 32/48:

#### Шаблон CorDis Plus Multiplex:

			Скорость нагрева	Скорость охлаждения
95 °С	3 мин		1,5 °С/с	1,5 °С/с
98 °С	20 с			
59 °С*	100 с	4 цикла	1,0 °С/с	1,5 °С/с
72 °С	90 с			
95 °С	20 с			
60 °С*	90 с	6 циклов	1,0 °С/с	1,5 °С/с
72 °С	90 с			
91 °С	25 с			
60 °С	90 с	21 цикл	1,0 °С/с	1,5 °С/с
70 °С*	60 с			
70 °С	5 мин		1,5 °С/с	1,5 °С/с

В случае, если используемая модель амплификатора не позволяет точно устанавливать скорость нагрева, рекомендуется воспользоваться секундомером для подбора рекомендуемой скорости. Например, в амплификаторах GeneAmp 9700 не предусмотрена возможность точного программирования скорости изменения температуры, но они позволяют ограничить скорость нагрева в процентном отношении. В приведенном ниже примере показаны подобранные значения скорости нагрева в процентном выражении для амплификатора GeneAmp 9700 с алюминиевым блоком в режиме эмуляции GeneAmp 9600.

- Рекомендуемые параметры ПЦР для прибора GeneAmp 9700:



При работе с малыми количествами ДНК (<0,1 нг ДНК) можно повысить чувствительность реакции, добавив 2–4 дополнительных цикла ПЦР. Не рекомендуется превышать 34 цикла. В этом случае возрастает опасность ошибки вследствие выпадения аллелей и дисбаланса гетерозигот.

После завершения программы ПЦР, амплифицированные продукты можно хранить неделю при 2...8 °С в защищенном от света месте. В случае, если амплифицированные продукты необходимо хранить более недели, рекомендуется заморозка при –20 °С.

## 4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05

При работе с генетическим анализатором НАНОФОР 05, и последующем анализе данных в программе **Фрагментный анализ ДНК**, необходимо следовать Руководству пользователя НАНОФОР 05 и Руководству пользователя по программному обеспечению ДНК ФА.

### 4.1 Проведение спектральной калибровки

**Важно!** Спектральная калибровка проводится после замены или установки линейки капилляров, используемых для анализа образцов, а также при передвижении прибора.

Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 5-ти цветным калибратором CS5. Спектральный калибратор содержит смесь из 5 фрагментов ДНК разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями (FAM, R6G, TAMRA, ROX, DY632). Эти красители использованы в наборе CO<sub>r</sub>DIS Plus (FAM, R6G, TAMRA, ROX) и в размерном стандарте S550 (DY632).

#### **Подготовка рабочего раствора спектрального калибратора:**

Приготовить раствор спектрального калибратора CS5 в соответствии с [пунктом 2.4](#). Затем приготовить рабочий раствор для проведения спектральной калибровки.

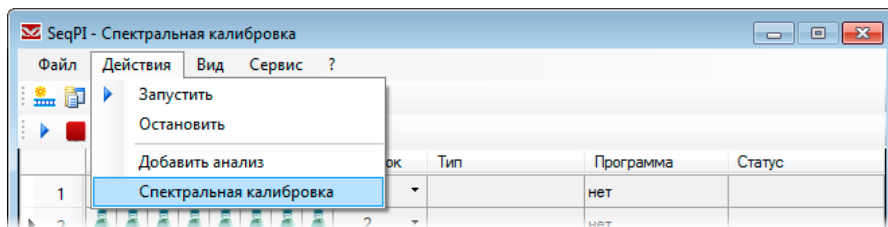
Компонент	На один ряд планшета
ДИ-формамид	80 мкл
Раствор CS5	4 мкл

Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки одного ряда 96-луночного планшета или в стрипованные пробирки (возможно нанесение в любой ряд планшета). При необходимости удалить пузыри со дна лунок (пробирок) коротким центрифугированием на микроцентрифуге Циклотемп-903 (для стрипов) или Eppendorf Centrifuge 5810 R (для плашек).

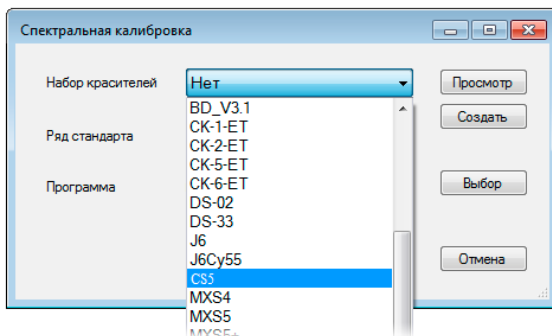
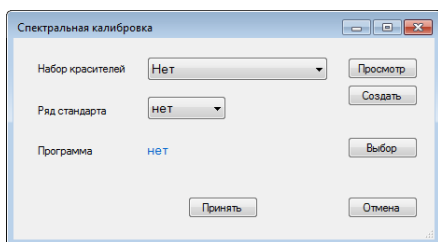
#### **Спектральная калибровка:**

##### **Шаг А Описание плашки для спектральной калибровки**

В главном окне программы SeqPI в меню Действия выбрать опцию Спектральная калибровка.



В появившемся окне Спектральная калибровка в строке Набор красителей выбрать CS5.



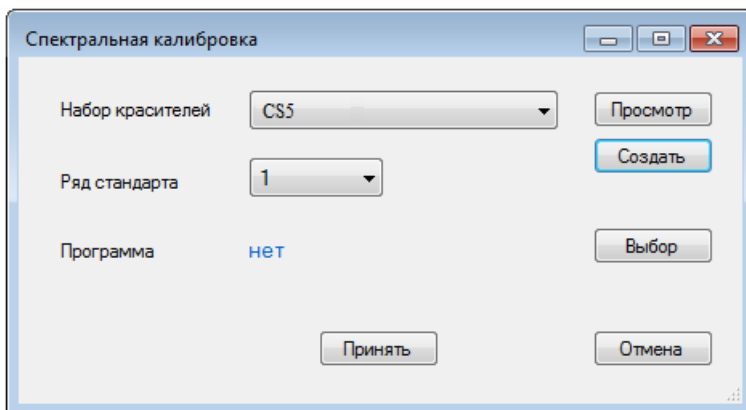
Если название набора красителей в списке отсутствует, то необходимо создать новый набор, нажав кнопку **Создать**. Появится окно **Создание набора красителей**, в котором необходимо заполнить все поля. В строке **Имя набора** указать CS5. Число красителей — 5. Заполнить таблицу **Свойства** следующим образом:

№	Название красителя	Цвет	Длина волны	Порядок
1	FAM	синий	520	5
2	R6G	зеленый	550	4
3	TMR	черный	580	3
4	ROX	красный	605	2
5	LIZ	оранжевый	650	1

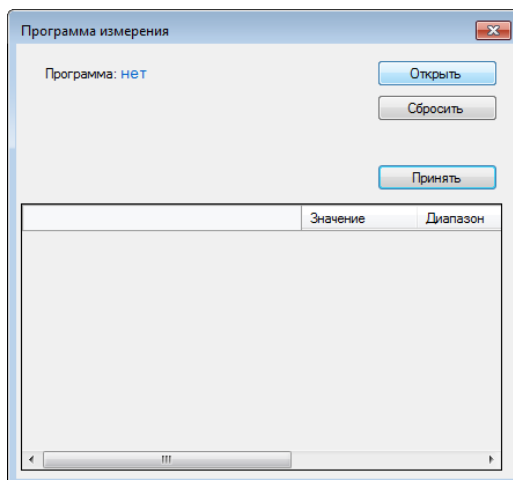
**Важно!** В таблице выделены столбцы с обязательной информацией! При неправильном вводе Порядка выхода красителей спектральная калибровка будет ошибочной!


После заполнения всех полей нажать кнопку Сохранить.

Во вновь появившемся окне Спектральная калибровка в строке Ряд стандарта выбрать номер ряда, в котором находятся пробирки с раствором спектрального калибратора (стандарт может находиться в любом ряду планшета), затем нажать кнопку Выбор.

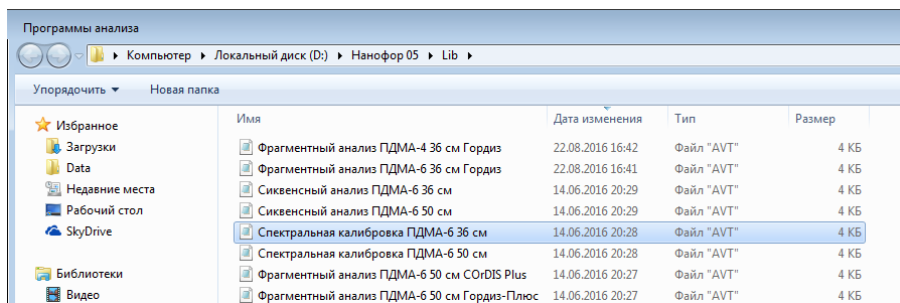


В открывшемся окне Программа измерения нажать кнопку Открыть.



**Важно!** Обратите внимание на **длину капилляров** (36 или 50 см) и **тип полимера**, установленных в приборе на момент анализа. Эти данные можно просмотреть, нажав .

В открывшемся окне Программы анализа в папке *D:\НАНОФОР 05\Lib* выбрать программу измерений (например, *Спектральная калибровка 36 см ПДМА-6.avt*), соответствующую длине установленных капилляров (36 см) и используемому типу полимера (ПДМА-6), и нажать кнопку Принять.

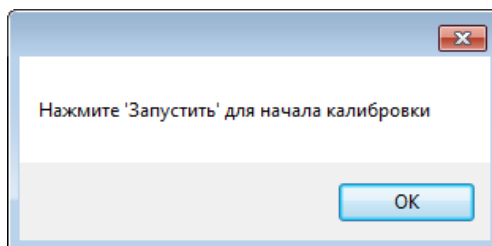


Рекомендуемые параметры программы спектральной калибровки зависят от длины капилляров и типа полимера:

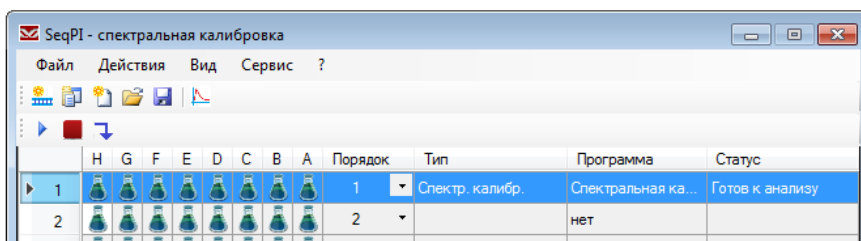
### Для полимера ПДМА-6

Характеристика	Длина капилляра	
	36 см	50 см
Температура первого термостата	60 °C	60 °C
Температура второго термостата	45 °C	45 °C
Напряжение префореза	15000 В	15000 В
Время префореза	180 с	180 с
Напряжение ввода пробы	3000 В	3000 В
Время ввода пробы	5 с	5 с
Напряжение электрофореза	15000 В	15000 В
Время электрофореза	1500 с	2000 с
Время исключения регистрации электрофореза	900 с	1400 с

В окне Спектральная калибровка нажать кнопку Принять. В появившемся окне нажать ОК.

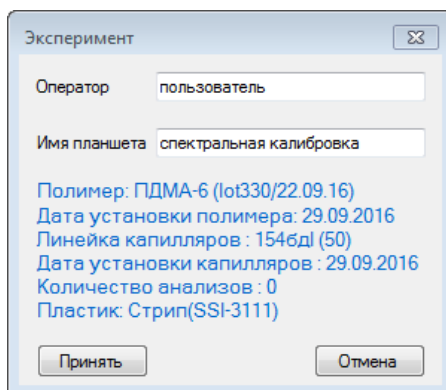


Активируется главное окно программы SeqPI. В графе Тип появится надпись типа анализа (Спектр. калибр.), в графе Программа — название программы анализа Спектральная калибровка ПДМА-6 36 см, а в графе Статус в выбранном ряду плашки появится надпись Готов к анализу.

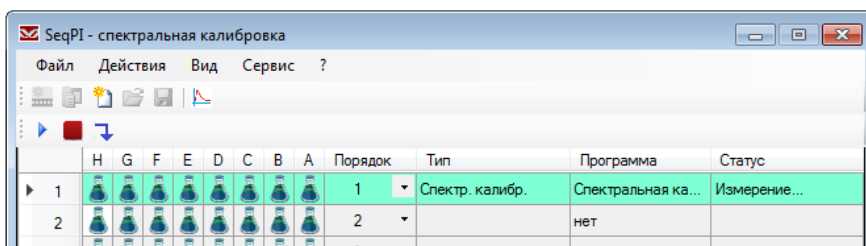




## **Шаг Б Проведение спектральной калибровки**

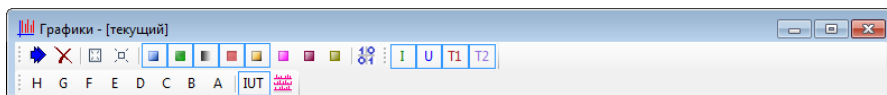
Для запуска спектральной калибровки в меню главного окна программы SeqPI нажать кнопку Запустить или в меню Действия выбрать опцию Запустить. В появившемся окне Эксперимент задать имя оператора в строке Оператор, название планшета в строке Имя планшета и нажать кнопку Принять.




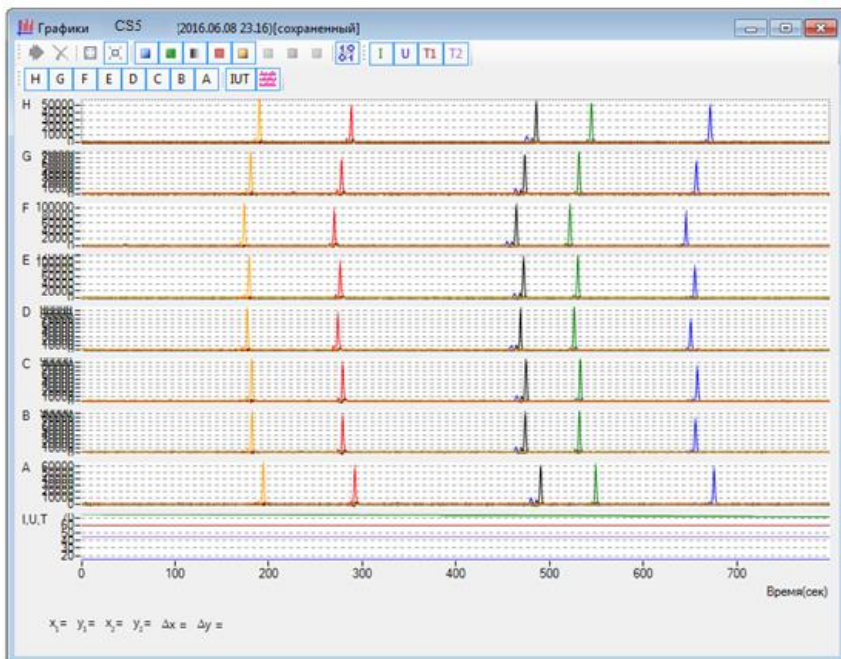
Анализируемый ряд плашки со спектральным калибратором выделится зеленым цветом, в графе Статус появится надпись Измерение.



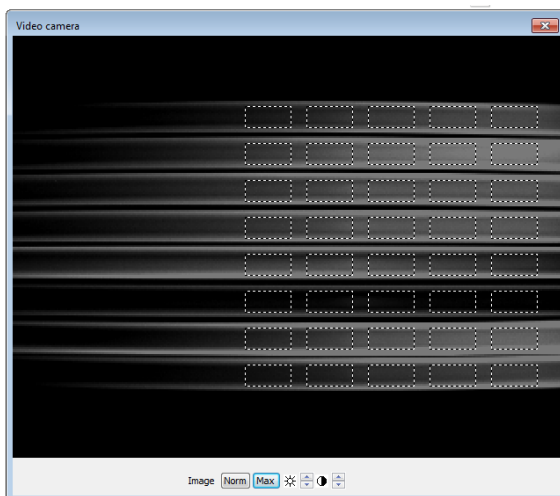
В ходе выполнения программы калибровки в окне **Графики**, вызываемом нажатием кнопки  в меню главного окна программы SeqPI, можно осуществлять просмотр данных с каналов флуоресценции  по каждому капилляру (кнопки **H...A**), а также значения тока (I), напряжения (U), температуры внутри термостатируемой кассеты (T1) и температуры термостатируемого детектора (T2), нажав **IUT**.



Активировав кнопку , можно просмотреть сигналы флуоресценции в нескольких капиллярах, а также значения I, U, T1 и T2.

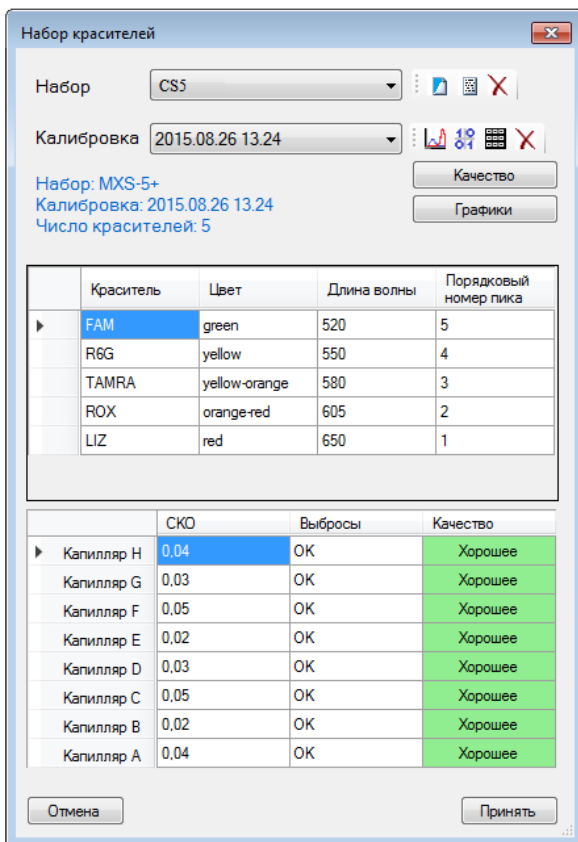


Одновременно можно наблюдать сигнал флуоресценции во всех капиллярах на изображении с видеокамеры, для чего необходимо в главном окне программы SeqPI в меню Сервис выбрать опцию Камера ПЗС.

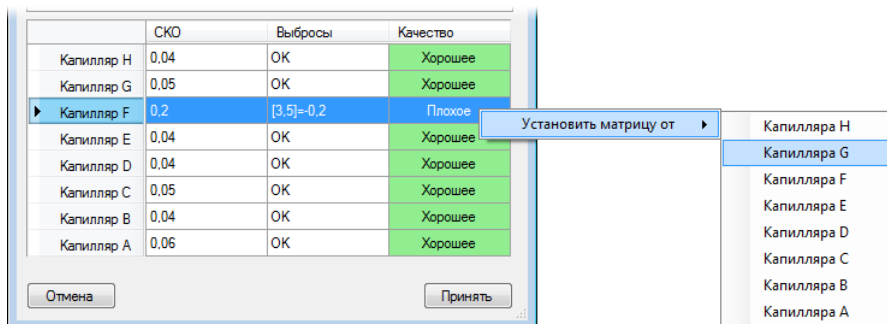


## Шаг В Оценка результатов спектральной калибровки

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



Для капилляров с оценкой качества спектральной калибровки **Удовлетворит.** или **Плохое**, можно (без гарантии хорошего качества последующих анализов) принять матрицу от капилляров, получивших оценку **Хорошее**. Для этого в окне **Набор красителей** правой кнопкой мыши выбрать капилляр, в котором требуется заменить матрицу. В появившейся опции **Установить матрицу от** выбрать капилляр (желательно ближайший) с матрицей хорошего качества. В окне **Изменение данных** нажать **Да**.



Если после этого в окне **Набор красителей** качество калибровки для всех капилляров установится **Хорошее**, нажать кнопку **Принять**. Калибровка сохранится под заданным в строке **Набор** названием и со временем ее проведения в формате *год. месяц. число. час. минута* начала калибровки.

При использовании CS5 в качестве спектрального калибратора, в окне **Графики**, при нажатой кнопке **8?** (**Применить матрицу**), должна отображаться следующая последовательность пиков (слева направо): **оранжевый-красный-черный-зеленый-синий** (рисунок 1).

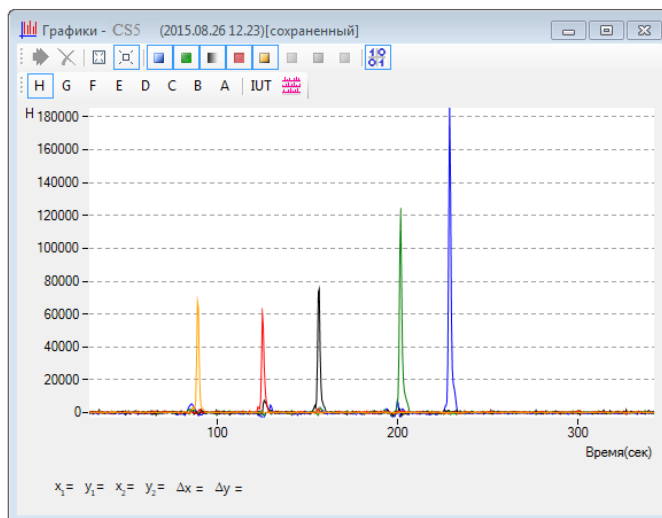


Рисунок 1. Электрофореграмма разделения спектрального калибратора CS5

## 4.2 Проведение капиллярного электрофореза

Для получения полного STR-профиля проводится фрагментный анализ - электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора COrDIS Plus.

### 4.2.1 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Перед загрузкой образцов в генетический анализатор НАНОФОР 05 необходимо приготовить смесь ДИ-формамида и размерного стандарта S550, разведенного в соответствии с [пунктом 2.2](#) в следующем соотношении:

Компонент	Объем на 1 образец
ДИ-формамид	10 мкл
Размерный стандарт S550	1 мкл

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

После перемешивания добавить по 10 мкл смеси в каждую лунку плашки/стрипа. Затем внести туда по **1 мкл ПЦР-продукта**. В отдельную лунку внести **1 мкл раствора аллельной лестницы**. Готовую смесь вортиксировать и центрифугировать (пузыри со дна лунок должны быть удалены).

---

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

---

Собрать плашку и загрузить в генетический анализатор НАНОФОР 05 в соответствии с **Руководством пользователя**.

Набор COrDIS Plus не требует температурной денатурации образцов!

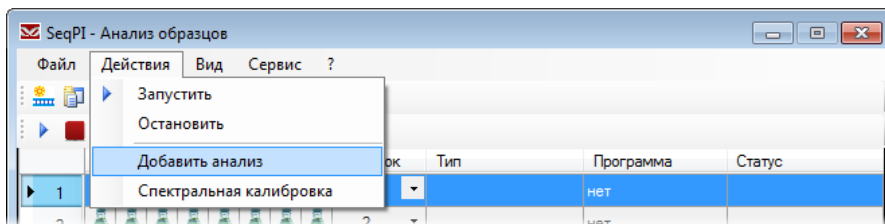
## 4.2.2 Запуск фрагментного анализа

Проведение капиллярного электрофореза на приборе НАНОФОР 05 проводится в соответствии с **Руководством пользователя**, предоставляемым производителем. Для получения корректных результатов анализа необходимо сначала провести соответствующую спектральную калибровку ([пункт 4.1](#)), затем провести фрагментный анализ, используя соответствующую программу измерений. После окончания фореа проанализировать полученные данные.

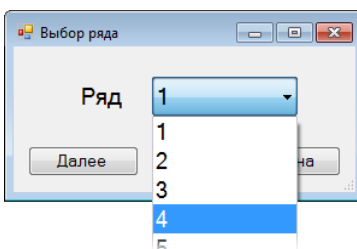
### **Шаг А** Описание плашки

Перед началом анализа следует описать расположение образцов в плашке и ввести другую необходимую информацию (**имя образца, тип образца, схема анализа, набор красителей, размерный стандарт**).

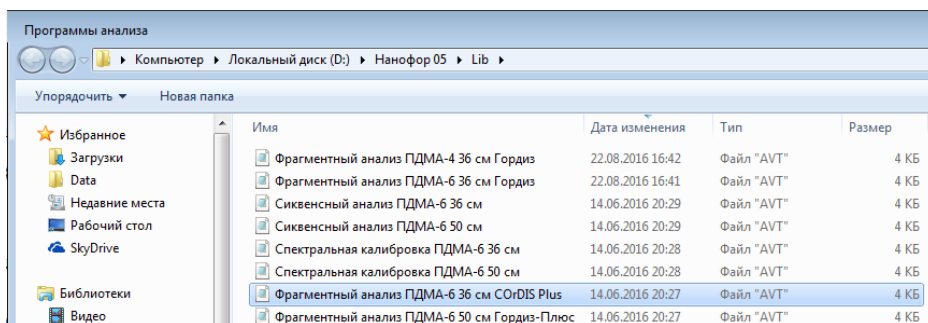
- 1) В меню Действия выбрать опцию **Добавить анализ**.




- 2) В окне **Выбор ряда** выбрать ряд плашки, в который загружены пробирки с образцами для анализа и нажать кнопку **Далее**.



- 3) В открывшемся окне **Программа измерений** нажать кнопку **Открыть** и в папке *D:\НАНОФОР 05\Lib* выбрать программу анализа (например, для полимера ПДМА-6 и капилляров длиной 36 см, нужно выбрать *Фрагментный анализ ПДМА-6 36 см COrDIS Plus.avt*).



**Важно!** Обратите внимание на **длину капилляров** (36 или 50 см) и **тип полимера**, установленных в приборе на момент анализа. Эти данные можно просмотреть, нажав  в главном окне программы SeqPI.

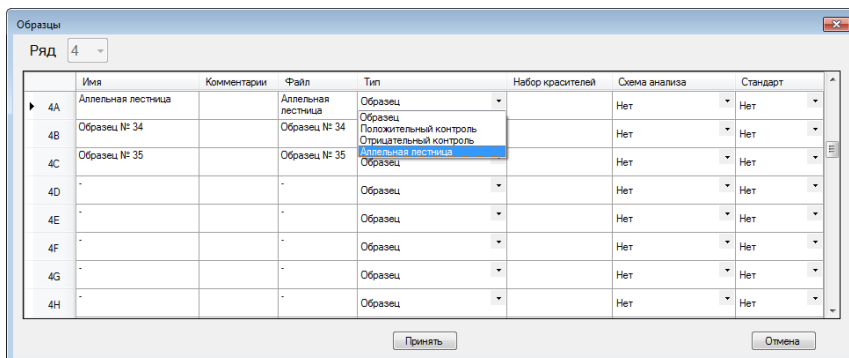
#### 4) Нажать кнопку Принять.

Рекомендуемые параметры программы анализа в зависимости от длины капилляров представлены в таблице:

#### Для полимера ПДМА-6

Характеристика	Длина капилляра	
	36 см	50 см
Температура первого термостата	60 °C	60 °C
Температура второго термостата	45 °C	45 °C
Напряжение префореза	15000 В	15000 В
Время префореза	180 с	180 с
Напряжение ввода пробы	3000 В	3000 В
Время ввода пробы	5 с	5 с
Напряжение электрофореза	10500 В	15000 В
Время электрофореза	4000 с	4200 с
Время исключения регистрации электрофореза	800 с	1000 с

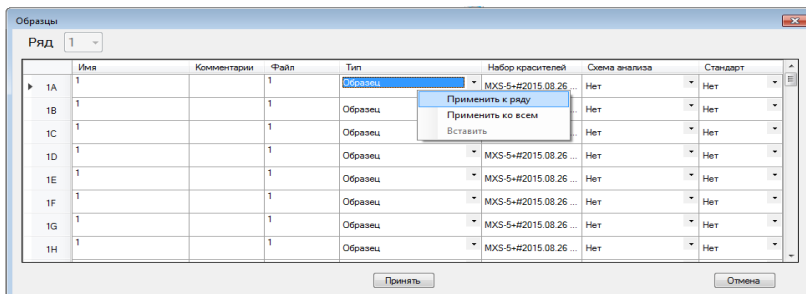
#### 5) В окне **Образцы** заполнить таблицу. Буква в начале каждой строки таблицы соответствует положению образца в выбранном ряду плашки.



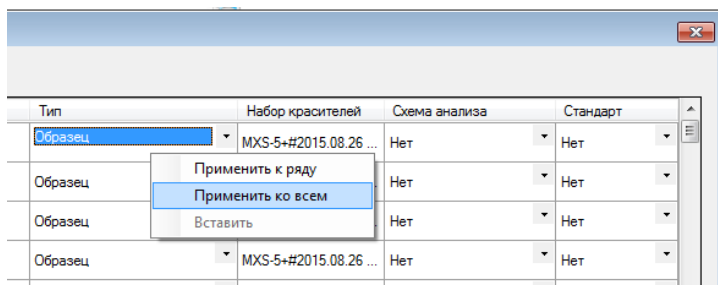
**Важно!** Обратите внимание на расположение рядов в плашке — нумерация рядов плашки **1–12** сверху вниз!

- В графе **Имя** вводится название или порядковый номер образца (необходимо ввести названия всех образцов; для лунок, не содержащих образцы, рекомендуется поставить прочерк).
- Автоматически в графе **Файл** названию файла присваивается введенное имя образца.
- В графе **Тип** выбрать из списка тип образца: **Образец**, **Положительный контроль**, **Отрицательный контроль**, **Аллельная лестница**.

Если выбираемый параметр одинаков для всех пробирок описываемого ряда плашки, то для ускорения заполнения таблицы можно выбрать опцию **Применить к ряду**. Для выбора этой опции, после ввода параметра образца, следует перевести курсор в ячейку ниже, нажать левую кнопку мыши, а затем правой кнопкой нажать на верхнюю ячейку с уже установленным параметром. В открывшемся окне выбрать пункт **Применить к ряду**. Автоматически заполнятся все строки столбца данного ряда.

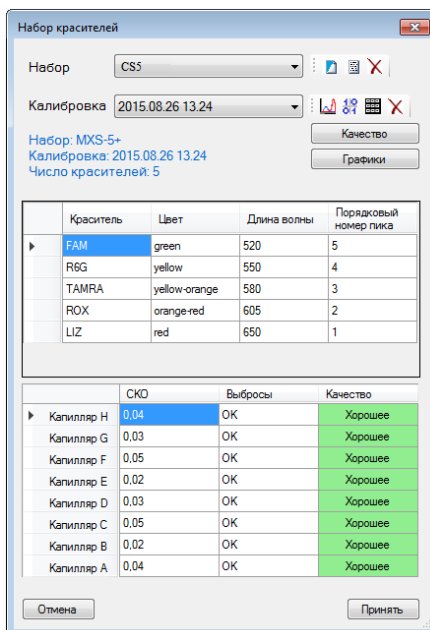


В случае, когда во всех рядах плашки загружен один и тот же тип образца, следует воспользоваться опцией **Применить ко всем**. Заданный тип образца автоматически будет применен ко всем образцам плашки.



Аналогично заполняются все столбцы таблицы.

- г) В графе **Набор красителей** выбрать спектральную калибровку соответствующую используемому набору и установленной линейке капилляров. Для этого навести указатель мыши на любую ячейку в графе **Красители** и двойным нажатием на левую кнопку мыши открыть окно **Набор красителей**. Выбрать в нем необходимую калибровку (например, **CS5 #2015.03...**), проверить качество (должно быть **Хорошее**) и нажать кнопку **Принять**.



- д) В графе **Схема анализа** выбрать метод анализа, например, **COrDIS Plus**.  
 е) В графе **Стандарт** выбрать **S550**.

Пример заполненной таблицы для ряда 1 приведен ниже:

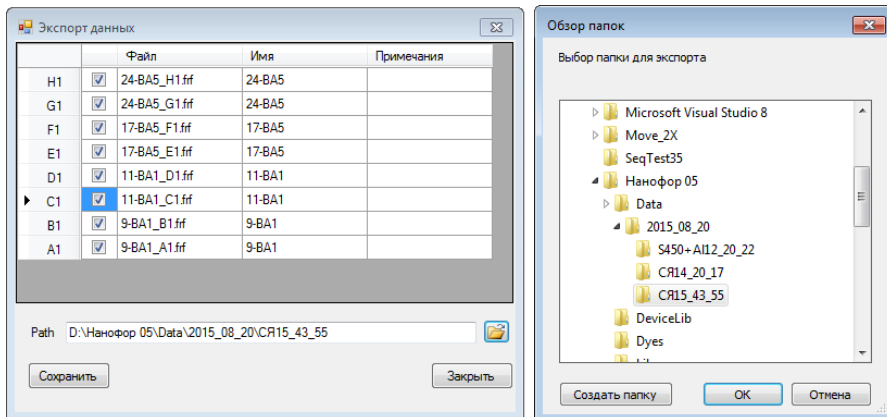
Ряд	Имя	Комментарии	Файл	Тип	Набор красителей	Схема анализа	Стандарт
1A	АЛ		АЛ	Аллепная лестница	CS5 #2015.08.12 ...	COrDIS Plus [Fr]	S550
1B	пко		пко	Положительный контроль	CS5 #2015.08.12 ...	COrDIS Plus [Fr]	S550
1C	око		око	Отрицательный контроль	CS5 #2015.08.12 ...	COrDIS Plus [Fr]	S550
1D	1		1	Образец	CS5 #2015.08.12 ...	COrDIS Plus [Fr]	S550
1E	2		2	Образец	CS5 #2015.08.12 ...	COrDIS Plus [Fr]	S550
1F	3		3	Образец	CS5 #2015.08.12 ...	COrDIS Plus [Fr]	S550
1G	4		4	Образец	CS5 #2015.08.12 ...	COrDIS Plus [Fr]	S550
1H	5		5	Образец	CS5 #2015.08.12 ...	COrDIS Plus [Fr]	S550

- 6) После заполнения всех столбцов для выбранного ряда нажать кнопку **Принять**. Откроется главное окно программы **SeqPI** и в графе **Статус** в выбранном ряду плашки появится надпись **Готов к анализу**.

	H	G	F	E	D	C	B	A	Порядок	Тип	Программа	Статус
1									1	Фрагментный	Фрагментный ан...	Готов к анализу
2									2		нет	

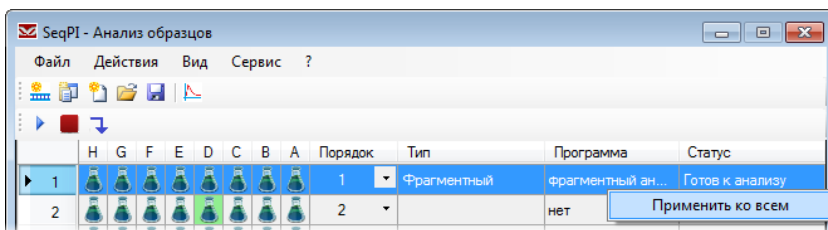
- 7) Для описания всей плашки (или ее части) требуется снова выбрать опцию **Добавить анализ** и повторить все описанные выше действия последовательно с каждым рядом плашки, заполненным образцами для анализа.
- 8) В описание планшета можно импортировать данные, экспортированные из лабораторной информационной системы (ЛИС), а также из приборов **НАНОФОР 05** или **ABI Prizm**. Для этого в меню **Файл** выбрать **Импорт** → **Описание планшета**. При этом будут импортированы только названия образцов (графы **Имя** и **Файл**), остальные столбцы (**Тип**, **Набор красителей**, **Схема анализа**, **Стандарт**) следует заполнить, как описано выше.

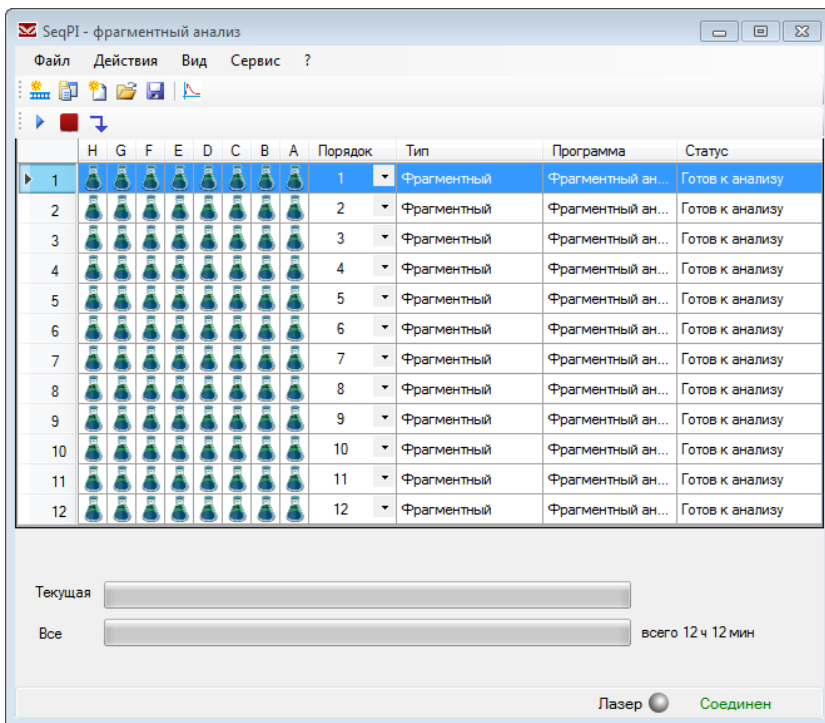
- 9) Полученные на приборе НАНОФОР 05 данные могут быть конвертированы в формат *.fsa*. Для этого в программе SeqPI нужно выбрать **Файл** → **Экспорт** → **Экспорт данных** и отметить  те файлы, которые должны быть записаны в формате *.fsa*:




При этом данные будут записываться как в формате *.frf* (для анализа программой ДНК ФА), так и в формате *.fsa* (для анализа с помощью другого программного обеспечения).

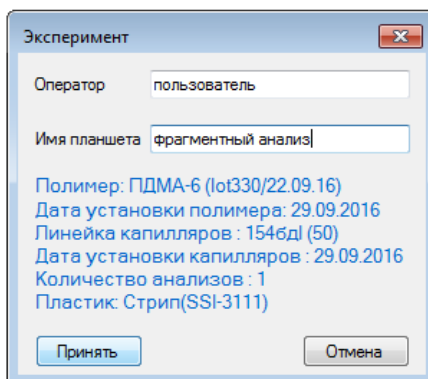
- 10) Если для анализа всех рядов плашки будет использоваться одна и та же программа, следует нажать правой кнопкой мыши на ячейку с уже заданной программой и выбрать **Применить ко всем**.



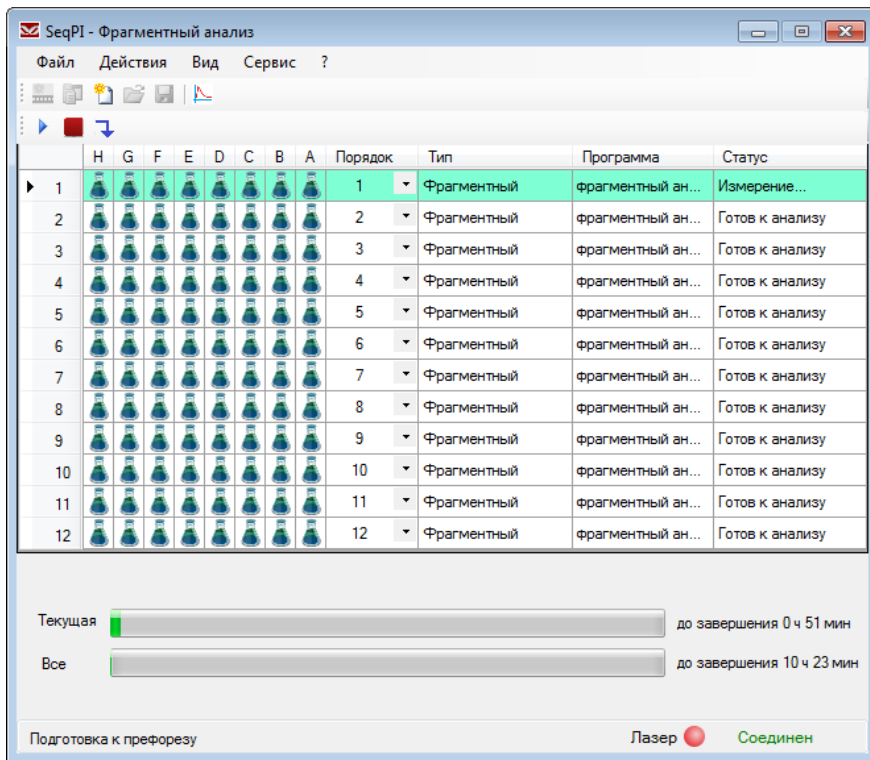


## Шаг Б Запуск анализа

- 1) После описания всех загруженных образцами рядов плашки, в меню главного окна программы SeqPI нажать кнопку  Запустить или в меню Действия выбрать опцию Запустить.
- 2) В открывшемся окне заполнить поля Оператор и Имя планшета.



- 3) Нажать кнопку **Принять**. Активируется главное окно программы SeqPI. Первый анализируемый ряд плашки выделится зеленым цветом, а в графе статус должна появиться надпись **Измерение**. В нижней части окна рядом с надписью **Лазер** серый индикатор должен стать красным — это означает, что лазер включен. В конце строки **Текущая** отобразится время до конца текущего анализа, а в конце строки **Все** — время до конца анализа всей плашки.



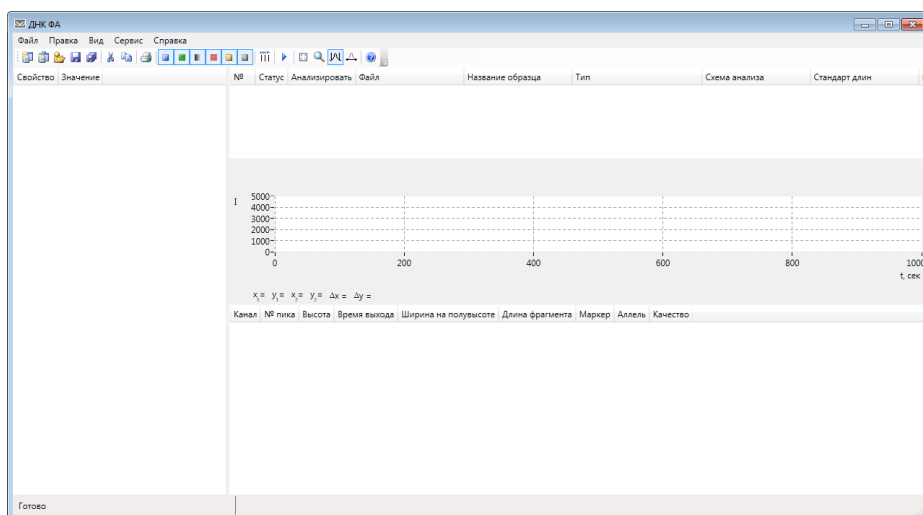
В ходе выполнения фрагментного анализа в окне **Графики**, вызываемом нажатием кнопки в меню главного окна программы SeqPI, можно осуществлять просмотр данных с каналов флуоресценции по каждому капилляру (кнопки H...A), а также значения тока (I), напряжения (U), температуры внутри термостатируемой кассеты (T1) и температуры термостатируемого детектора (T2), нажав **IUT**. Активировав кнопку , можно просмотреть сигналы флуоресценции в нескольких капиллярах, а также значения I, U, T1 и T2.

## 5. АНАЛИЗ ДАННЫХ


После завершения программы измерений, данные следует проанализировать. Анализ данных проводится с помощью программы Фрагментный анализ ДНК (ДНК ФА).

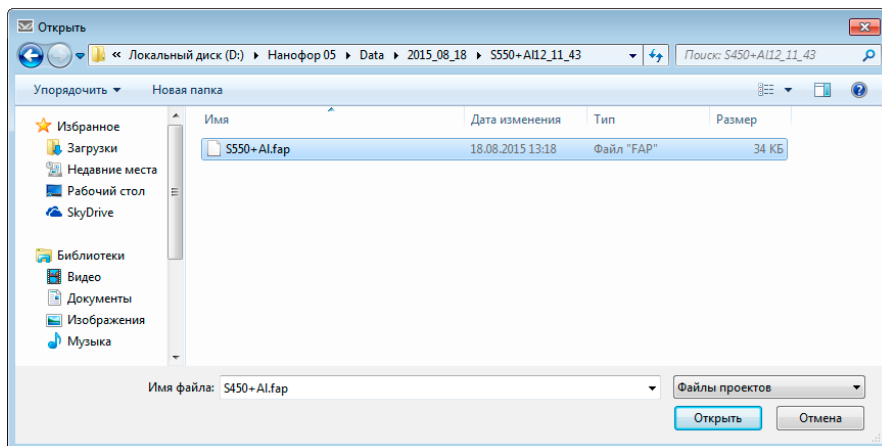
### 5.1 Запуск анализа



Запустить программу Фрагментный анализ ДНК. Откроется Основное окно программы.

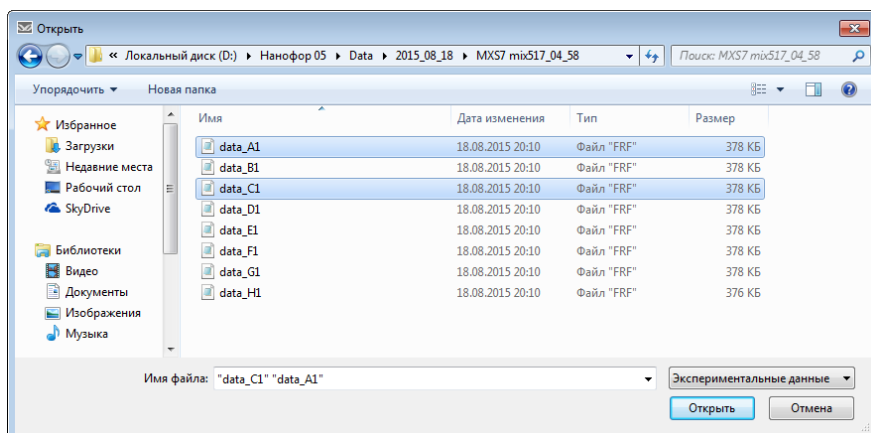


Образцы для анализа могут быть добавлены двумя способами:

- 1) **Файл проекта.** Файл проекта сохраняется в папке: *D:\НАНОФОР 05\Data\год\_месяц\_число\название плашки час минута секунда* начала анализа и имеет расширение *.far*. В меню **Файл** выбрать пункт **Открыть проект** (или нажать кнопку ). В открывшемся окне выбрать нужный файл и нажать **Открыть**. При этом будут открыты данные по всем образцам данного проекта.



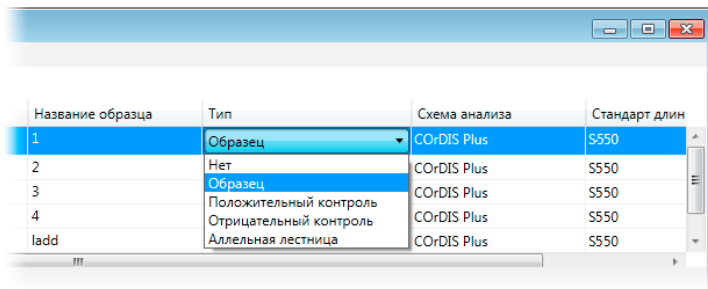
- 2) Отдельные файлы образцов. В меню **Файл** выбрать пункт **Добавить файлы** (или нажать кнопку ). В открывшемся окне отметить нужные файлы и нажать **Открыть**. К текущему проекту добавятся только они. Программа ДНК ФА также может анализировать файлы, полученные на приборах AVIPrizm, имеющих расширение *.fpa* и *.hid*. Открыть такие файлы для анализа можно аналогично, с помощью опции **Добавить файлы** (или нажав кнопку ).



Перед проведением анализа необходимо убедиться, что для каждого образца заданы все необходимые параметры, а именно, **Тип**, **Схема анализа**, **Стандарт длин**. Как правило, все эти параметры уже введены в программе SeqPl при описании плашки ([пункт 4.4](#)).

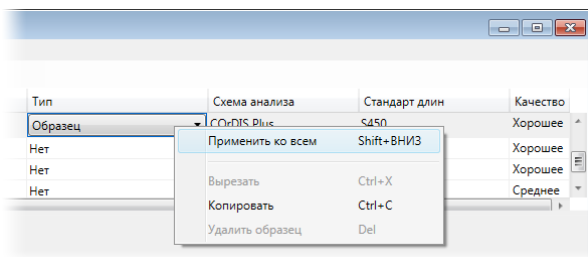
Если данные параметры не заданы, то для каждого добавленного образца требуется их задать:

- 1) В графе Тип выбрать из списка один из типов образца: **Образец**, **Положительный контроль**, **Отрицательный контроль**, **Аллельная лестница**.



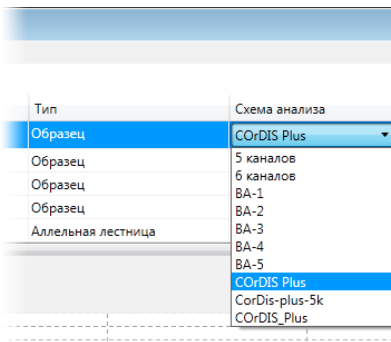
Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин
1	Образец	CO <sub>r</sub> DIS Plus	S550
2	Нет	CO <sub>r</sub> DIS Plus	S550
3	Образец	CO <sub>r</sub> DIS Plus	S550
4	Положительный контроль	CO <sub>r</sub> DIS Plus	S550
ladd	Отрицательный контроль	CO <sub>r</sub> DIS Plus	S550
	Аллельная лестница	CO <sub>r</sub> DIS Plus	S550

Для того, чтобы применить выбранный параметр ко всем ячейкам столбца (т. е. для всех образцов), нажать левой кнопкой мыши по пустой ячейке, затем правой кнопкой — по уже заполненной ячейке. В выпадающем списке выбрать команду **Применить ко всем** (выполняется аналогично для всех столбцов таблицы).



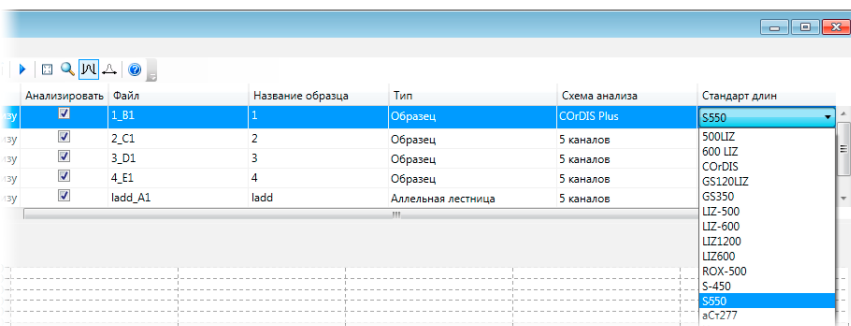
**Важно!** Среди всех анализируемых образцов хотя бы один образец должен быть с типом **Аллельная лестница**.

- 2) В графе Схема анализа выбрать CORDIS Plus.




В случае, если данная схема анализа отсутствует в списке, необходимо создать её, выполнив действия, описанные в [пункте 5.2](#).

- 3) В графе Стандарт длин выбрать S550.



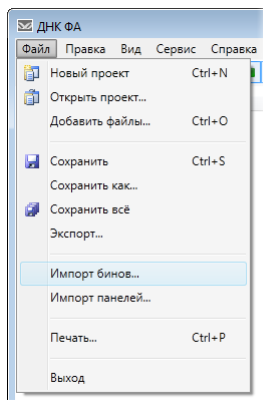
В случае, если необходимый стандарт длины отсутствует в списке, выполните действия, описанные в [пункте 5.3](#), чтобы его создать.

- 4) В графе Анализировать отметить символом  каждый образец, для которого требуется провести анализ.
- 5) Нажать кнопку **▶ Запустить анализ**, которая находится на панели инструментов основного окна программы **ДНК ФА**. Процесс выполнения анализа отображается на индикаторе  в строке состояния в нижнем левом углу окна. После завершения анализа появляется надпись **Готово**.

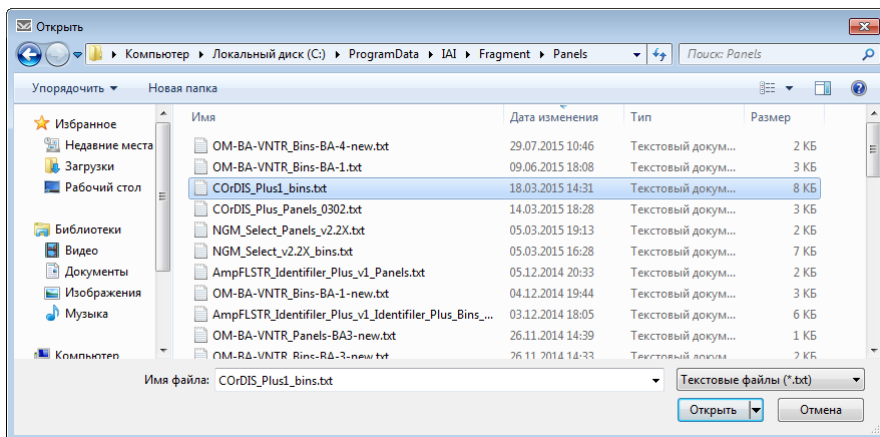
## 5.2 Создание схемы анализа

### Шаг А Импорт бинов

1) Перейти **Файл** → **Импорт бинов**.



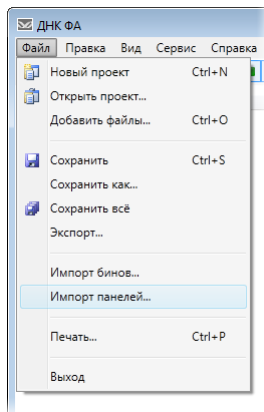
2) Выбрать в папке *C:\ProgramData\IAI\Fragment\Panels* файл с актуальными бинами (предоставляет производитель наборов ООО «ГОРДИЗ»).



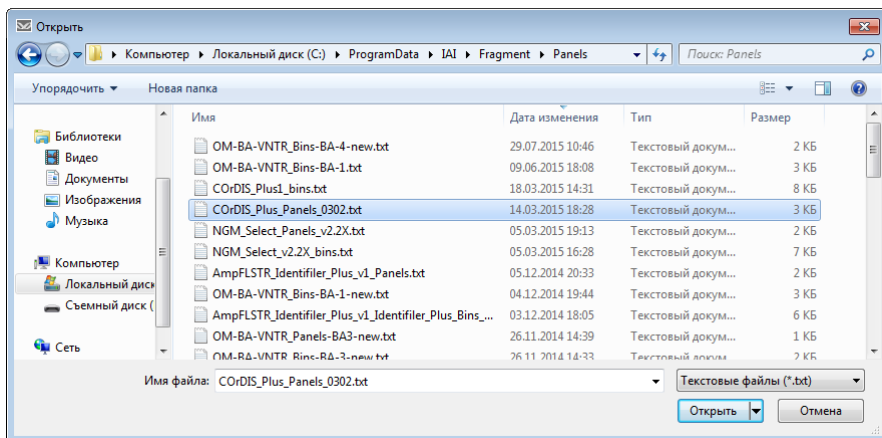
3) Если в папке отсутствует файл, запросить его у производителя наборов, скопировать в указанную папку и выбрать через опцию **Импорт бинов**.

## Шаг Б Импорт панелей

1) Перейти **Файл** → **Импорт панелей**.

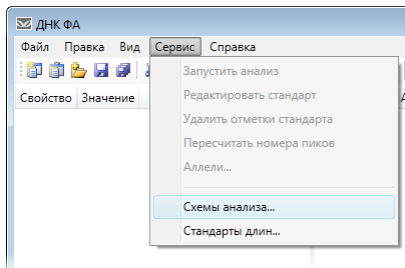


2) Импортировать панели аналогично импорту бинов.

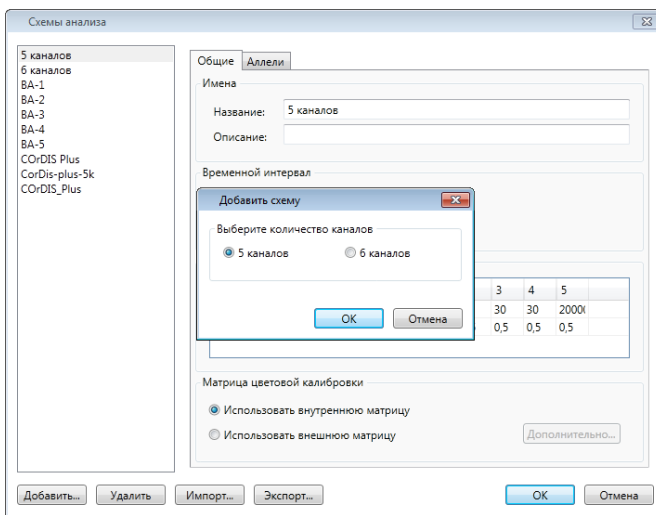


## Шаг В Создание схемы

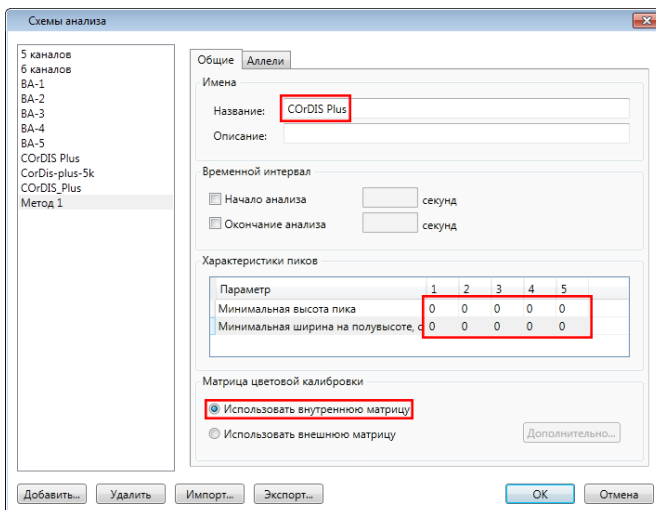
1) Перейти **Сервис** → **Схемы анализа**.



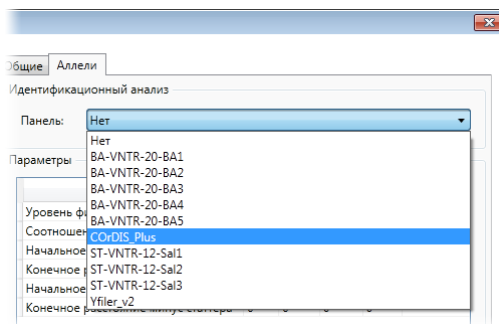
- 2) В окне **Схемы анализа** нажать кнопку **Добавить**, в окне **Добавить схему** выбрать количество каналов — **5** и нажать **OK**.



- 3) Во вкладке **Общие** исправить появившееся **Название** на **CORDIS Plus**, в таблице **Характеристика пиков** установить все значения равными 0, и убедиться, что маркер  матрицы цветовой калибровки активирован для использования внутренней матрицы.



- 4) Во вкладке **Аллели** развернуть список **Панель** и выбрать **CORDIS Plus**.

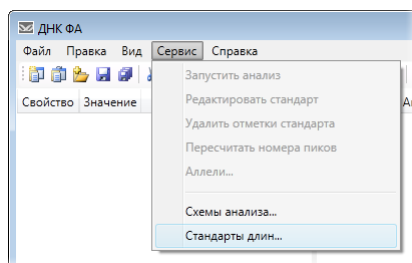


- 5) В таблице **Параметры** установить рекомендованные производителем набора значения и нажать **ОК**.

Параметры	Три	Тетра	Пента	Гекса
Уровень фильтрации минорных пиков	0,2	0,2	0	0
Соотношение минусА	0,1	0,1	0	0
Начальное расстояние минусА	0,7	0,7	0	0
Начальное расстояние минус статтера	2,25	3,25	0	0
Конечное расстояние минусА	1,3	1,3	0	0
Конечное расстояние минус статтера	3,75	4,75	0	0

### 5.3 Создание стандарта длины

- 1) Перейти  
Сервис → Стандарты длин.



- 2) В окне **Стандарты длин** нажать кнопку **Добавить**, в части окна **Параметры** ввести **Название** стандарта длины **S550**, а в списке **Канал** выбрать **№5**.



## 5.4 Стандарт длины S550

Ниже приводится пример электрофоретического разделения 24 фрагментов стандарта длины S550 в канале детекции LIZ (5 канал). Размеры фрагментов: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450 и 550.

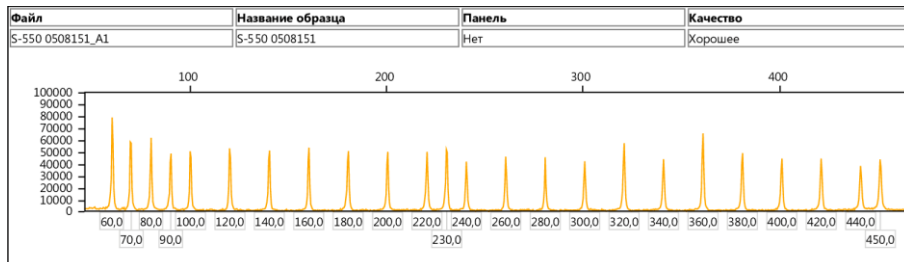



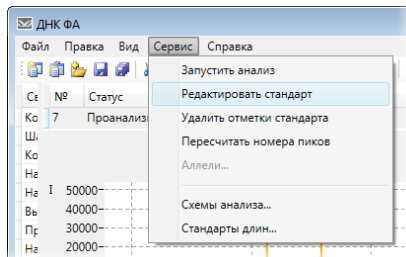
Рисунок 2. Электрофореграмма разделения размерного стандарта S550

## 5.5 Интерпретация результатов анализа

После завершения анализа в графе **Качество** для каждого образца появляется оценка качества: *Хорошее* (найжены все пики размерного стандарта), *Среднее* (не найден один пик размерного стандарта) или *Плохое* (не найдено более одного пика размерного стандарта).

Для получения итогового протокола анализа пригодны образцы с качеством *Хорошее* и *Среднее*. Для образцов с оценкой качества *Плохое* необходимо, в случае видимого отсутствия пиков размерного стандарта, повторить анализ с момента приготовления образца для электрофореза ([пункт 4.3](#)). В случае наличия пиков стандарта длин, необходимо произвести их расстановку “вручную”. Для этого нужно:

- 1) Оставить только канал , соответствующий красителю, входящему в состав фрагментов стандарта длин (5 канал).
- 2) Перейти **Сервис** → **Редактировать стандарт**.

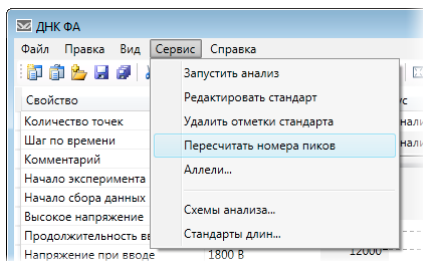


- 3) Ввести в столбце **Длина фрагмента**

значения, соответствующие пикам стандарта длин, и каждый из них отметить  как Пик стандарта.

№	Канал	№ пика	Высота	Время выхода	Ширина на полувысоте	Длина фрагмента	Пик стандарта	Маркер	Аллель	Качество
5	673	997	1608,6	1,11	0,0		<input type="checkbox"/>			Хорошее
5	674	8927	1621,4	2,57	360,0		<input checked="" type="checkbox"/>			Хорошее
5	675	979	1648,5	0,72	0,0		<input type="checkbox"/>			Хорошее
5	676	1426	1653,8	2,27	0,0		<input type="checkbox"/>			Хорошее
5	677	1039	1699,9	1,88	0,0		<input type="checkbox"/>			Хорошее
5	678	6039	1708,9	2,53	380,0		<input checked="" type="checkbox"/>			Хорошее
5	679	1154	1713,1	0,94	0,0		<input type="checkbox"/>			Хорошее
5	680	18357	1782,0	2,80	0,0		<input type="checkbox"/>			Хорошее
5	681	5104	1796,0	2,64	400,0		<input checked="" type="checkbox"/>			Хорошее
5	682	850	1861,2	1,71	0,0		<input type="checkbox"/>			Хорошее
5	683	5739	1881,2	2,95	420,0		<input checked="" type="checkbox"/>			Хорошее
5	684	969	1915,9	1,14	0,0		<input type="checkbox"/>			Хорошее
5	685	3662	1964,2	2,86	440,0		<input checked="" type="checkbox"/>			Хорошее
5	686	5751	2001,5	2,79	450,0		<input checked="" type="checkbox"/>			Хорошее

- 4) Перейти Сервис →  
Пересчитать номера пиков.



Пример результата анализа с оценкой качества *Хорошее* приведен на рисунке 3 и в таблице 2:

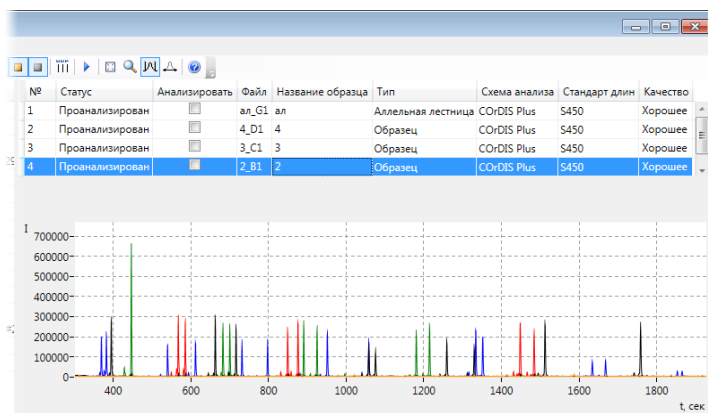



Рисунок 3. Образец с оценкой качества *Хорошее*

Таблица 2. Раскладка аллелей проанализированного образца с оценкой качества *Хорошее*.


Канал	№ пика	Высота	Время выхода	Ширина на полувысоте	Длина фрагмента	Маркер	Аллель	Качество
1	10	204048	369,3	1,77	82,0	AMEL	X	Хорошее
1	12	208814	382,2	1,71	84,9	AMEL	Y	Хорошее
1	22	160205	539,8	1,91	119,8	D3S1358	14	Хорошее
1	32	175946	611,7	1,78	136,9	D3S1358	18	Хорошее
1	41	163568	731,5	1,81	163,6	TH01	6	Хорошее
1	47	167003	797,5	1,85	179,3	TH01	9.3	Хорошее
1	61	220452	951,4	2,05	214,1	D12S391	15	Хорошее
1	64	178311	1058,2	2,05	238,5	D12S391	21	Хорошее
1	80	237813	1333,7	2,18	301,1	D1S1656	15	Хорошее
1	83	203308	1351,7	2,21	305,3	D1S1656	16	Хорошее
1	93	75889	1634,5	2,36	371,4	D10S1248	14	Хорошее
1	96	81298	1668,7	2,38	379,4	D10S1248	16	Хорошее
1	101	27326	1853,6	2,63	424,1	D22S1045	15	Хорошее
1	102	28063	1865,8	2,45	427,2	D22S1045	16	Хорошее
2	126	640862	446,5	1,71	98,5	D2S441	11	Хорошее
2	143	248485	682,5	2,01	152,6	D7S820	9	Хорошее
2	146	245952	700,2	1,93	156,5	D7S820	10	Хорошее
2	159	263082	890,6	1,82	200,7	D13S317	9	Хорошее
2	164	243093	924,8	1,82	208,3	D13S317	11	Хорошее
2	177	214394	1180,5	2,13	266,4	FGA	19.2	Хорошее
2	179	249891	1214,6	2,16	274,2	FGA	21.2	Хорошее
3	230	286002	394,8	1,80	87,7	TPOX	8	Хорошее
3	245	295513	662,7	1,74	148,3	D18S51	12	Хорошее
3	252	246454	716,2	1,76	160,0	D18S51	15	Хорошее
3	265	142712	1058,1	2,12	238,5	D16S539	11	Хорошее
3	268	123735	1075,5	2,15	242,4	D16S539	12	Хорошее
3	277	174041	1259,1	2,14	284,3	D8S1179	11	Хорошее
3	281	142927	1329,6	2,20	300,1	D8S1179	15	Хорошее
3	292	266214	1512,2	2,36	342,5	CSF1PO	10	Хорошее
3	301	250486	1758,5	2,54	400,8	D5S818	12	Хорошее
4	335	289702	567,4	1,85	126,4	vWA	17	Хорошее
4	338	277464	585,3	1,87	130,7	vWA	18	Хорошее
4	346	235163	849,2	1,89	191,2	D21S11	31	Хорошее
4	350	281260	875,7	1,90	197,3	D21S11	32.2	Хорошее
4	359	274890	1448,3	2,43	327,9	SE33	23.2	Хорошее
4	364	221496	1483,9	2,41	336,0	SE33	25.2	Хорошее

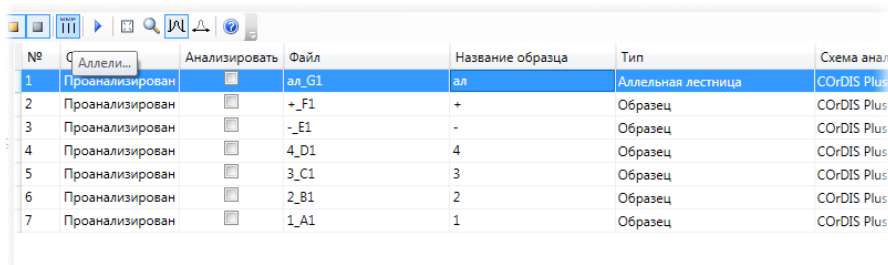
Результаты анализа образцов с оценкой качества *Хорошее* и *Среднее* доступны для просмотра в окне *Аллели* (кнопка ).

Для анализа результатов рекомендуется следующий алгоритм:


### Шаг А Анализ аллельной лестницы

**Важно!** Проводится при оценке качества *Хорошее* или *Среднее*. Если для аллельной лестницы качество определено как *Плохое*, повторный электрофорез необходимо провести для всей серии образцов.

- 1) В основном окне ДНК ФА выделить строку с аллельной лестницей и нажать кнопку  Аллели.



№	Аллели...	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анали
1	Проанализирован	<input checked="" type="checkbox"/>	ал_G1	ал	Аллельная лестница	CO <sub>r</sub> DIS Plus
2	Проанализирован	<input type="checkbox"/>	+_F1	+	Образец	CO <sub>r</sub> DIS Plus
3	Проанализирован	<input type="checkbox"/>	-_E1	-	Образец	CO <sub>r</sub> DIS Plus
4	Проанализирован	<input type="checkbox"/>	4_D1	4	Образец	CO <sub>r</sub> DIS Plus
5	Проанализирован	<input type="checkbox"/>	3_C1	3	Образец	CO <sub>r</sub> DIS Plus
6	Проанализирован	<input type="checkbox"/>	2_B1	2	Образец	CO <sub>r</sub> DIS Plus
7	Проанализирован	<input type="checkbox"/>	1_A1	1	Образец	CO <sub>r</sub> DIS Plus

- 2) Нажать кнопку  Печать.
- 3) Визуально убедиться, что все пики фрагментов аллельной лестницы имеют под ось X значения, соответствующие их длине и количеству коротких тандемных повторов (рисунок 4).

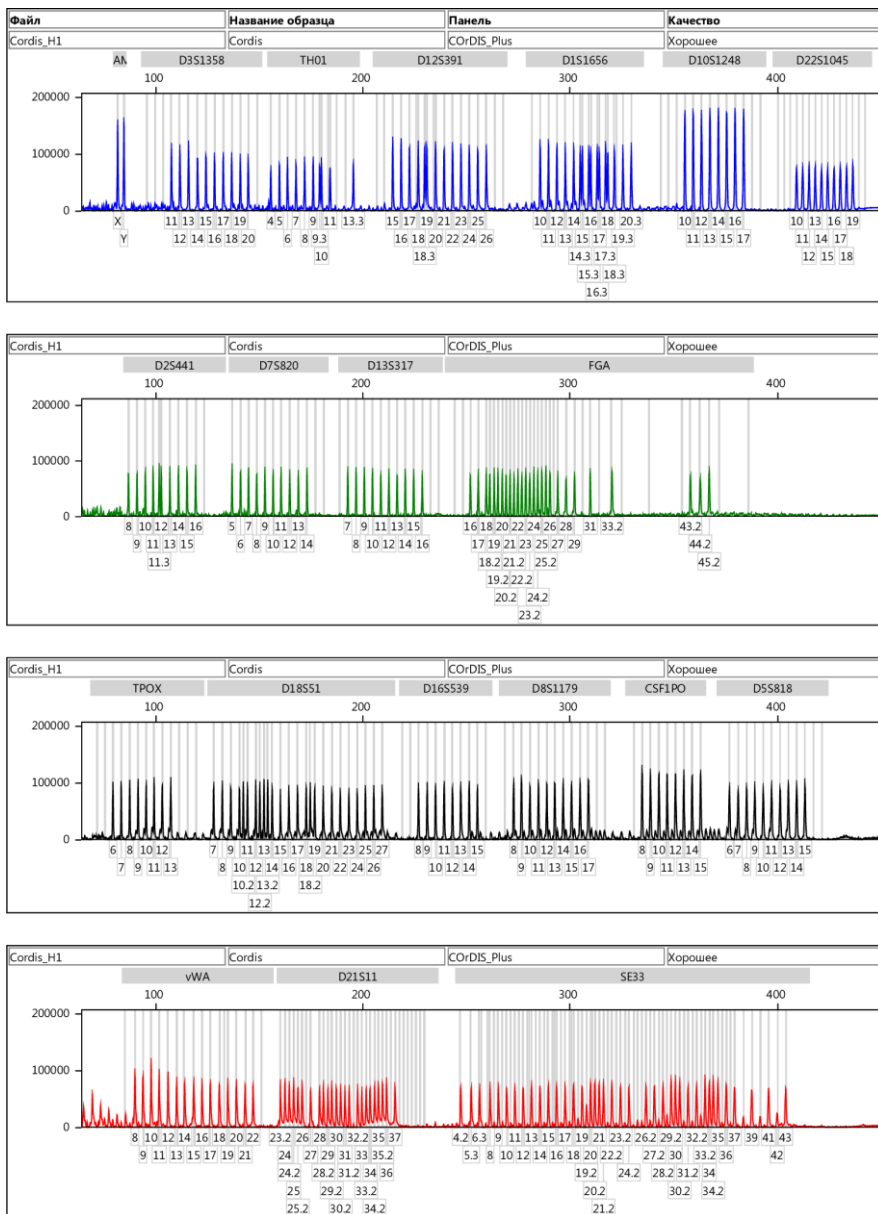


Рисунок 4. Электрофореграмма разделения аллельной лестницы CO<sup>R</sup>DIS Plus

### Шаг Б Анализ контрольной ДНК

Аналогично процедуре, описанной для анализа аллельной лестницы, результат анализа для контрольного образца должен иметь качество *Хорошее* или *Среднее*, и выглядеть аналогично приведенному на рисунке 5.

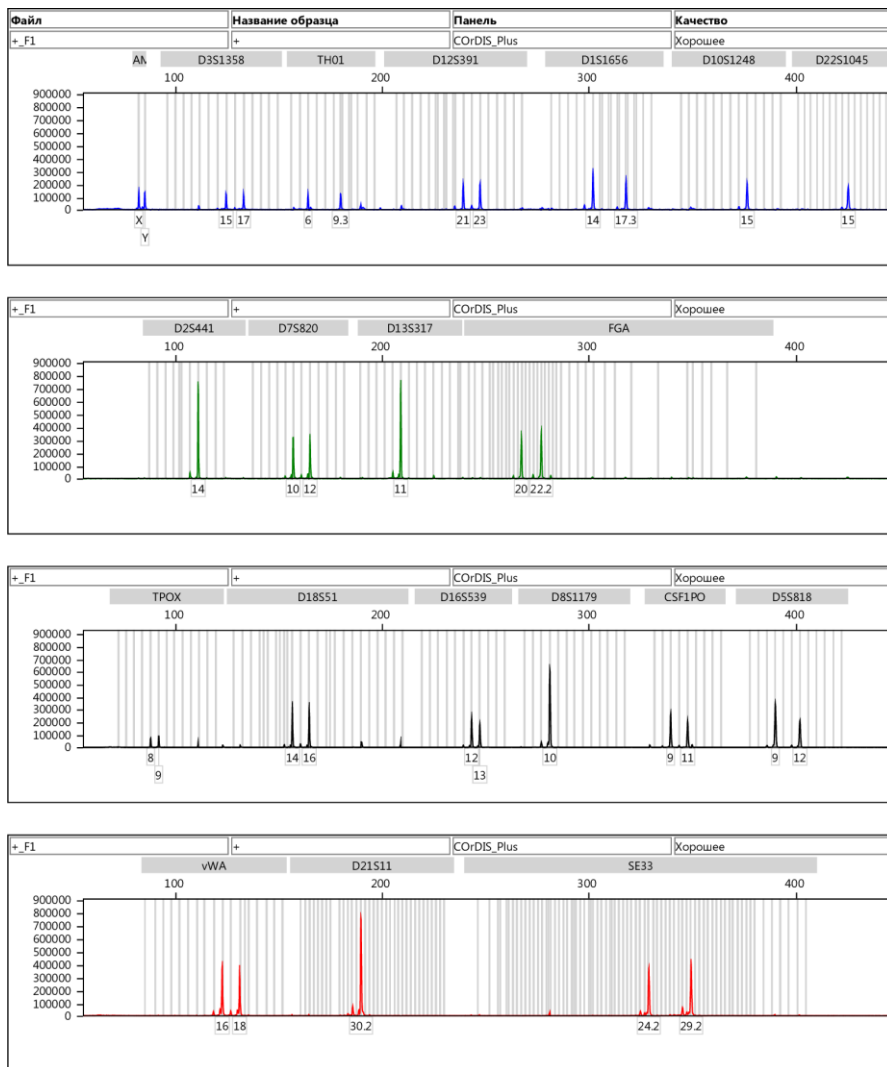


Рисунок 5. Электрофореграмма разделения контрольной ДНК

## Шаг В Анализ отрицательного контрольного образца

Необходимо убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

## Шаг Г Анализ остальных образцов

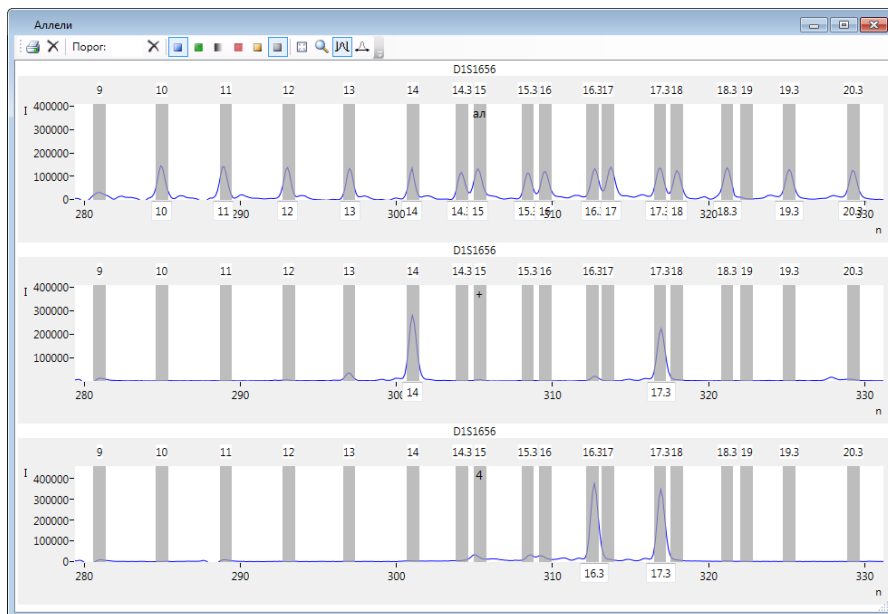
Аналогично процедуре, описанной для анализа аллельной лестницы, анализируются все остальные образцы с оценкой качества *Хорошее* и *Среднее*. Для образцов с качеством *Плохое*, необходимо провести расстановку пиков размерного стандарта “вручную”, как описано на страницах 42-44.

Для сравнения результатов нескольких образцов, следует отметить эти образцы в таблице *Параметры образцов*, удерживая клавишу **Ctrl**. Затем нажать кнопку **III Аллели**.

Отключая последовательно кнопки отображения каналов детекции



, можно получить в окне совмещенные электрофореграммы нескольких образцов. Ниже показан одновременный просмотр результатов анализа аллельной лестницы, образца контрольной ДНК и исследуемого образца по локусу D1S1656:



Отсечь пики с интенсивностью меньшей, чем задана в поле **Порог**, можно нажав на кнопку **✕ Применить порог**. Для обновления результата после применения порога, необходимо закрыть окно **Аллели** и открыть его заново.

Удалить подпись под пиком можно, выставив курсор в соответствующий квадрат под пиком и нажав кнопку **✕ Удалить подпись**.

Графики можно распечатать, нажав кнопку  **Печать**.

## 5.6 Диапазоны размеров аллелей STR маркеров

Таблица 3. Диапазон длин аллелей.

Локус	Диапазон аллелей	Диапазон длин фрагментов	Аллели МК-1	Цвет метки
Amelogenin X	X	81	X	синий
Amelogenin Y	Y	84	Y	синий
D3S1358	8–21	93–147	15/17	синий
TH01	3–14	152–196	6/9.3	синий
D12S391	13–28	204–264	21/23	синий
D1S1656	9–21	275–324	14/17.3	синий
D10S1248	8–21	338–390	15/15	синий
D22S1045	8–19	400–450	15/15	синий
D2S441	8–19	84–134	14/14	зеленый
D7S820	5–16	137–181	10/12	зеленый
D13S317	5–17	188–236	11/11	зеленый
FGA	12.2–51.2	238–391	20/22.2	зеленый
TPOX	4–16	66–113	8/9	желтый
D18S51	7–27	124–200	14/16	желтый
D16S539	4–16	208–356	12/13	желтый
D8S1179	7–20	262–214	10/10	желтый
CSF1PO	5–16	317–361	9/11	желтый
D5S818	6–18	369–413	9/12	желтый
VWA	10–25	94–155	16/18	красный
D21S11	24–41.2	158–228	30.2/30.2	красный
SE33	4.2–50.2	233–403	24.2/29.2	красный

---

## 6. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

---

<b>Производитель набора:</b>	ООО «ГОРДИЗ»
<b>Юридический и почтовый адрес:</b>	115201, г. Москва, Каширское шоссе, 22 корп. 4 стр. 7
<b>Телефон/факс:</b>	+7 (495) 988-02-94
<b>Домашняя страница:</b>	<a href="http://www.gordiz.ru">www.gordiz.ru</a>
<b>E-mail:</b>	<a href="mailto:gordiz@gordiz.ru">gordiz@gordiz.ru</a>

---

