

Хорея (болезнь) Гентингтона (НТТ)

**Набор реагентов для определения количества СAG-повторов в 1 экзоне гена *НТТ*
методом капиллярного электрофореза**

ИНСТРУКЦИЯ по применению

Содержание

1.	ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	4
1.1.	Описание набора	4
1.2.	Область применения	4
2.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.....	5
2.1.	Состав набора	5
2.2.	Количество анализируемых проб	5
2.3.	Условия хранения и транспортирования, срок годности.....	5
2.4.	Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование	5
3.	ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	5
3.1.	Подготовка к проведению реакции амплификации.....	5
3.2.	Проведение амплификации.....	6
4.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (НАНОФОР 05)	7
4.1.	Подготовка раствора спектрального калибратора.....	7
4.2.	Запуск спектральной калибровки.....	7
4.3.	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	7
4.4.	Запуск фрагментного анализа.....	8
5.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (AB3500/AB3500XL).....	8
5.1.	Проведение спектральной калибровки	8
5.1.1.	Создание DyeSets	8
5.1.2.	Подготовка раствора спектрального калибратора.....	9
5.1.3.	Запуск спектральной калибровки.....	10
5.2.	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	10
5.3.	Запуск фрагментного анализа.....	11
6.	АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	11
6.1.	Анализ данных в программах GeneMarker	11
6.1.1.	Импорт файлов для анализа данных.....	11
6.1.2.	Создание проекта анализа данных	11
6.1.3.	Анализ размерного стандарта	12
6.1.4.	Анализ положительного контрольного образца (ПКО)	13
6.1.5.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	15
6.1.6.	Анализ образца.....	15
6.2.	Анализ данных в Gene Mapper	15
6.2.1.	Импорт файлов для анализа данных.....	15
6.2.2.	Анализ данных	16
6.2.3.	Анализ размерного стандарта	16
6.2.4.	Анализ положительного контрольного образца (ПКО)	16

6.2.5. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	17
6.2.6. Анализ образца	17
7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	17

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание набора

Набор реагентов «Хорея (болезнь) Гентингтона (НТТ)» предназначен для выявления наследственного прогрессирующего нейродегенеративного заболевания, вызванного экспансией СAG-триплетных повторов в первом экзоне гена НТТ, расположенного на коротком плече 4 хромосомы (4p16) и кодирующего белок гентингтин (НТТ).

Ген НТТ кодирует белок гентингтин, функция которого до конца не установлена. Доказано, что хорея Гентингтона развивается в результате увеличения числа тринуклеотидных повторов — цитозин-аденин-гуанин. Триплет цитозин-аденин-гуанин кодирует аминокислоту глутамин, поэтому в белке образуется удлиненный полиглутаминовый тракт. Формируя подобие «замка-застежки», расширенный полиглутаминовый участок белка гентингтина изменяет свою собственную конформацию и прочно соединяется с другими белками. В результате происходит агрегация белков, нарушаются межбелковые взаимодействия, что приводит к апоптозу клеток.

Клинические признаки болезни Гентингтона проявляются, как правило, в возрасте 40-50 лет, но могут отмечаться и в более раннем возрасте. По мере развития болезни амплитуда и частота гиперкинезов постепенно увеличиваются, нарастает «гримасничанье», нарушается походка (раскачивающаяся, «пританцовывающая»), речь (слова произносятся медленно, прерываются гиперкинезами артикуляционной мускулатуры и лишними звуками), затем больные теряют способность самостоятельно передвигаться и обслуживать себя. Постепенно развиваются изменения психики (депрессии, тревога, раздражительность, эмоциональная неустойчивость, апатия, суицидальные попытки, разнообразные психозы) и деменция (нарушение памяти, замедление познавательных функций, снижение критического отношения к своему состоянию). Одной из наиболее ярких клинико-генетических особенностей болезни Гентингтона является феномен антиципации, т.е. нарастание тяжести болезни и появление ее в более молодом возрасте в последующих поколениях.

Генетическое исследование является основным методом подтверждения диагноза и основано на подсчете числа СAG-повторов с помощью метода фрагментного анализа в гене НТТ.

В наборе используется смесь специфических праймеров: СП-1 и СП-2. При получении гомозиготного результата с СП-1 необходимо повторить анализ со смесью СП-2 для подтверждения или опровержения гомозиготности исследуемого образца. Так как при использовании только СП-1, есть вероятность получить ложноотрицательный результат¹.

Разделение ампликонов, полученных в результате ПЦР, проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов (например Нанофор 05/ Applied Biosystems 3500).

Для получения достоверного генотипа исследуемого образца достаточно 1 нанограмм (нг) не деградированной ДНК. Диапазон концентраций ДНК для проведения амплификации от 1 до 50 нг в реакцию.

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

1.2. Область применения

Набор может быть использован только для научно-исследовательских целей. Набор не предназначен для применения в медицине или ветеринарии.

¹ doi: 10.1111/ene.14772

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

2.1. Состав набора

№	Наименование	Состав	Объем, мкл	Количество, шт
1	РС	Реакционная смесь	1500	2
2	СП1	Смесь специфических праймеров 1	500	1
3	СП2	Смесь специфических праймеров 2	500	1
4	ПКО	Положительный контрольный образец	15	1
5	СД-450	Стандарт длин – набор фрагментов известной длины (60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450)	120	1
6	H ₂ O	Деионизованная H ₂ O	1000	1

2.2. Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение 100 реакций, включая контрольные образцы.

2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности

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

Транспортирование – при температуре от +4 до +8°C в течение недели.

Срок годности набора – 12 месяцев.

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

1. Спектральный калибратор «СК-5» (REF СК-0501)
2. Штатив для микропробирок 1,5 мл (“PM-96x1,5 /2,0“, кат. № СТ-17).
3. Пробирки 1,5 или 2,0 мл.
4. Штатив для 96-ти луночных ПЦР планшет или стрипов. (“ПЦР-96“, кат. № СТ-12).
5. Дозатор переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.
6. Наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.
7. 96-ти луночные ПЦР планшеты или микропробирки в стрипах для ПЦР.
8. Пленка для 96-ти луночных ПЦР планшет или крышки к микропробиркам в стрипах.
9. Центрифуга-вортекс для пробирок объемом 1,5 или 2 мл (Циклотемп-901).
10. Центрифуга для 96-ти луночных ПЦР планшет.
11. Прибор для проведения ПЦР.
12. Полимер для проведения капиллярного электрофореза (ПДМА-4/ПДМА-6).
13. Буфер для проведения капиллярного электрофореза (ТАПС).
14. Деионизованный формамид.
15. Автоматический генетический анализатор (Нанофор 05/AB 3500).

3. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

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

Таблица 2. Расчет рабочей реакционной смеси

Реагент	Расход реагентов	
	на 1 реакцию, мкл	рекомендуемое количество для N образцов
РС	15	15×N
СП1/СП2	5	5×N
ДНК	1-5	
H ₂ O	до конечного объема 25 мкл	

где N – количество образцов

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

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

1. Разморозить пробирки с РС и СП, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
2. В отдельной чистой пробирке подходящего объема смешать необходимый объем РС и СП1/СП2 (согласно таблице), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по 20 мкл приготовленной рабочей реакционной смеси.
4. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в пробирки (на стенку) от 1 до 5 мкл исследуемых образцов. При необходимости, общий объем довести до 25 мкл деионизованной H₂O.
5. В одну из пробирок (планшеты, стрипы) с приготовленной рабочей реакционной смесью внести 5 мкл деионизованной H₂O (отрицательный контрольный образец), а в другую пробирку (планшет, стрип) внести 1 мкл ПКО (положительный контрольный образец) и 4 мкл деионизованной H₂O.
6. Закрыть ПЦР пробирки.
7. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

3.2. Проведение амплификации

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

Температура	Время	
95 ⁰ С	5 мин	
95 ⁰ С	15 сек	35 циклов
63 ⁰ С	15 сек	
72 ⁰ С	25 сек	
72 ⁰ С	25 мин	

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

4. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (НАНОФОР 05)

Для получения профиля проводится фрагментный анализ – электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «Хорея (болезнь) Гентингтона (НТТ)».

Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 5-цветным калибратором **СК-5**.

4.1. Подготовка раствора спектрального калибратора

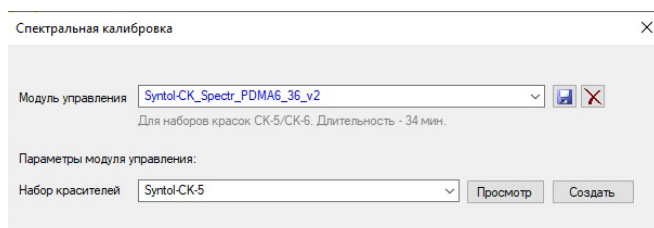
1. В отдельной пробирке смешать **Ди-формаид** и **раствор СК-5** по протоколу:

Ди-Формаид	80 мкл
СК-5	8 мкл

2. Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки одного ряда 96-луночного планшета (возможно нанесение в любой ряд планшета) или в стрипы. При необходимости удалить пузыри со дна лунок (пробирок) кратким центрифугированием.
4. Установить 96-луночный планшет или стрипы в прибор для капиллярного электрофореза.

4.2. 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 «Syntol-CK_Spectr_PDMA4_36_v2», подходящий к сочетанию капиллярной сборки и типа полимера. В качестве набора красителей выбрать «Syntol-CK-5»



4. Нажать «Принять». В основном окне рабочей программы нажать «Запустить» для начала калибровки.

4.3. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

1. Приготовить смесь Ди-формаида и размерного стандарта **СД-450** в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Ди-формаид	10
Стандарт длины СД-450	1

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

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

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

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

4.4. Запуск фрагментного анализа

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
Вид полимера	ПДМА-6
Напряжение ввода пробы [В]	3000
Время ввода пробы [сек]	5
Напряжение электрофореза [В]	12200
Время электрофореза [сек]	2000
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	1

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

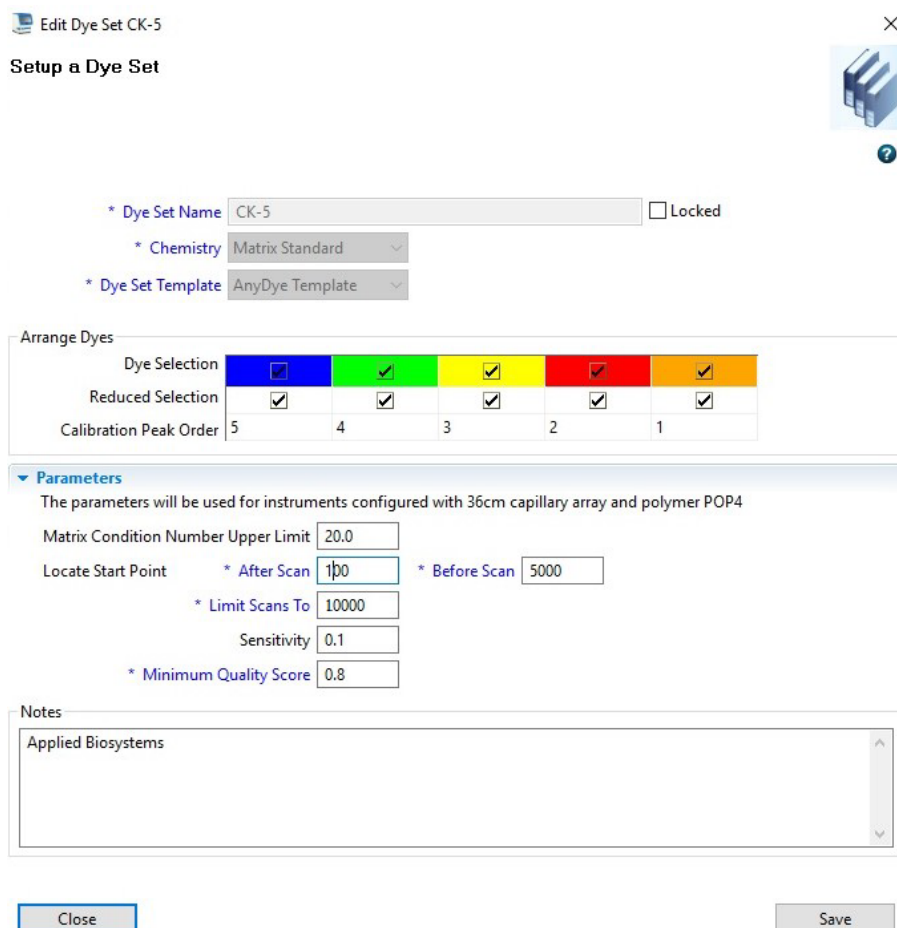
5. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (AB3500/AB3500XL)

5.1. Проведение спектральной калибровки

Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с пятицветным калибратором **СК-5**.

5.1.1. Создание DyeSets

1. Открыть программу **Data Collection Software**.
2. Нажать по иконке «**Library**» в левом верхнем углу окна.
3. В разделе «**Analyze**» выбрать вкладку «**DyeSets**».
4. В верхней части нажать кнопку «**Create**».
5. В открывшемся окне в поле «**Dye Set Name**» написать **СК-5**, в поле «**Chemistry**» из выпадающего списка выбрать «**Matrix Standard**», а в поле «**Dye Set Template**» из выпадающего списка выбрать «**AnyDye Template**».
6. В таблице «**Arrange Dyes**» установить последовательность пиков, на вкладке «**Parameters**» установить диапазон пиков и время электрофореза.



ПРИМЕЧАНИЕ! Время электрофореза «Limit Scans To» зависит от длины капилляров и типа полимера.

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

5.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

1. В отдельной пробирке смешать **Ди-формамид** и раствор **СК-5** по протоколу:

	AB3500	AB3500XL
Ди-формамид	80 мкл	240 мкл
СК-5	8 мкл	24 мкл

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

3. Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки:

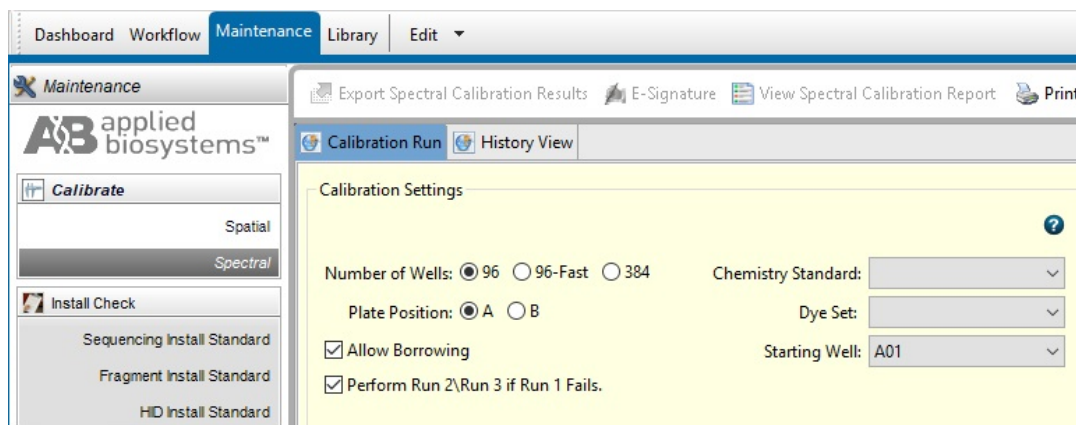
ПРИМЕЧАНИЕ! В случае 24-капиллярного генетического анализатора – внести раствор в три ряда 96-луночного планшета (возможно внесение в 1-3, 4-6, 7-9, 10-12 ряды планшета) или в стрипы.

В случае 8-капиллярного генетического анализатора - внести раствор в ряд 96-луночного планшета или в стрипы.

4. Установить 96-луночный планшет или стрипы, с раствором калибратора **СК-5** в прибор для капиллярного электрофореза.

5.1.3. 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 **CK-5**, 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 «**Accept**» в нижней части окна.

5.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Приготовить смесь Ди-формамида и размерного стандарта **СД-450** в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Ди-формаמיד	10
Стандарт длины СД-450	1

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

1. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
2. Добавить по **10 мкл** смеси в каждую лунку плашки/стрипа.
3. Внести в смесь по 1 мкл ПЦР-продукта.
4. Закрыть плашку/стрип.
5. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
6. Денатурировать образцы 5 мин при 95°C, охладить до 4°C

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

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

5.3. Запуск фрагментного анализа

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе проводится в соответствии с руководством пользователя, предоставляемым производителем. Рекомендуемые параметры электрофореза для комбинации капилляров 36 см и полимера POP4:

Параметры	Рекомендуемое значение
Injection Voltage, [kVolts]	3
Injection Time, [sec.]	5
Run Voltage, [kVolts]	12.2
Data delay [sec]	1
Run Time [sec]	1700

ПРИМЕЧАНИЕ! Время электрофореза – «**Run Time**» и время исключения регистрации электрофореза – «**Data Delay**» зависит от типа полимера и длины капилляров и настраивается пользователем в зависимости от используемой комбинации капилляров и полимера.

6. АНАЛИЗ ДАННЫХ

6.1. Анализ данных в программах GeneMarker

6.1.1. Импорт файлов для анализа данных

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

1. Запустить программу **GeneMarker**. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в выпавшем списке «**Panel Editor**».
2. В открывшемся окне выбрать «**File**» в выпавшем списке «**Import Panels**».
3. Выбрать файл панели (**Syntol_HTT_1/Syntol_HTT_2**) и подгрузить его в программу **GeneMarker**. Панель **Syntol_HTT_1** используется для анализа образцов со смесью СП-1, а панель **Syntol_HTT_2** используется для СП-2.
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 файл размерного стандарта (**СД-450**) и подгрузить его в программу **GeneMarker**.
8. Закрыть окно «**Size Template Editor**».

6.1.2. Создание проекта анализа данных

1. Запустить программу «**GeneMarker**». Кликнуть по «**Open Data**» в окне «**Start your project**».
2. Нажать «**Add**» и загрузить нужные файлы.
3. После добавления файлов нажать «**OK**».

4. Нажать на «Run». Или запустить анализ нажав на клавишу «Run Project» в верхнем меню.
5. В открывшемся окне «Run Wizard» в графе «Template Name» в графе «Panel» выбрать панель «Syntol_HTT_1» или «Syntol_HTT_2», в графе «Size Standard» выбрать размерный стандарт «CD-450» и нажать «Next».
6. В следующем окне в графе «Min Intensity» (минимальная интенсивность) установить значение, отсекающее артефактные пики (например, 100), и нажать «Next».
7. Параметры в следующем окне оставить без изменения и нажать «OK».

6.1.3. Анализ размерного стандарта

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

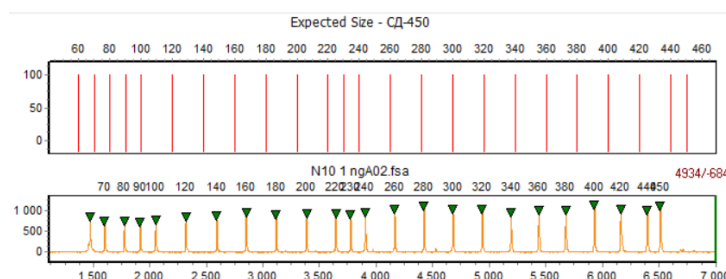


2. В открывшемся окне «Calibration Charts» проверить все образцы по списку и убедиться, что оценка качества размерного стандарта не ниже 96 баллов из 100. Если это верно для всех образцов, то дальнейшие действия не требуются, окно можно закрыть.

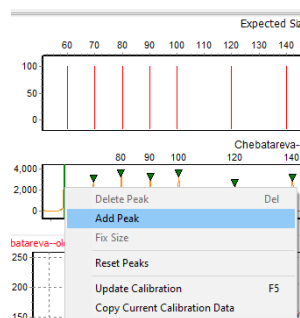
No.	Sampl...	Score
1	Cheb...	98
2	Cheb...	98
3	Kono...	98
4	Kono...	98
5	Shtuk...	98
6	Shtuk...	98

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

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

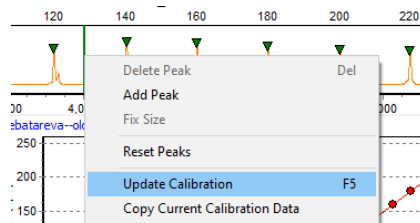


5. Если на каких-то пиках треугольников не хватает, нужно их проставить, нажав правой кнопкой мыши на нужный пик и выбрав в выпавшем меню «Add Peak». Для удобства график можно масштабировать.



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

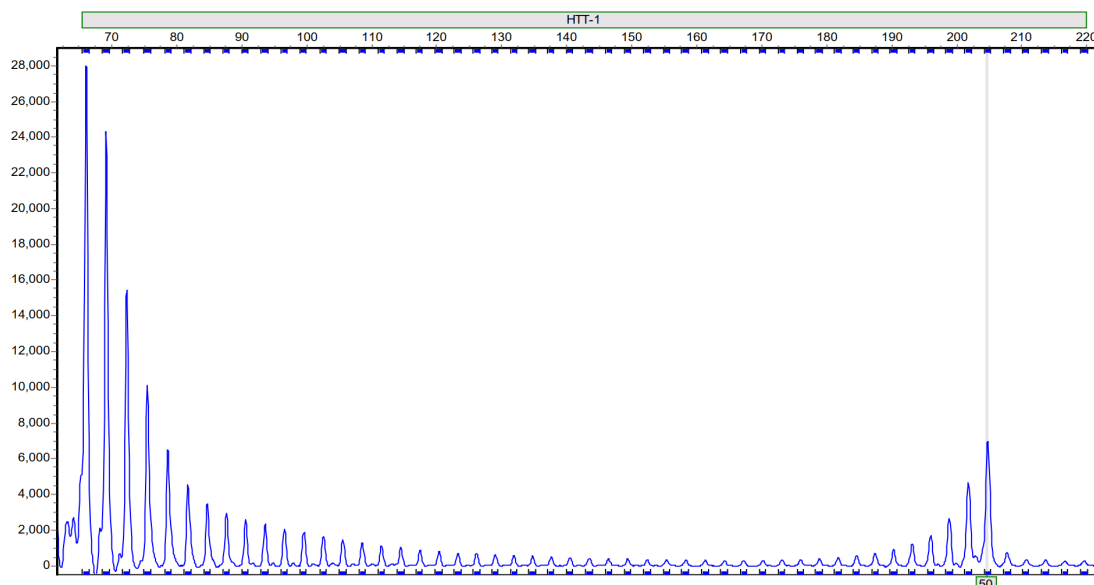
7. По окончании корректировки пиков стандарта выбранного образца, нужно правой кнопкой мыши нажать на свободное поле между пиками и в выпадающем меню выбрать «Update Calibration». Повторить процедуру для всех образцов, качество размерного стандарта которых ниже 96 баллов. Закрыть окно «Calibration Charts»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



6.1.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

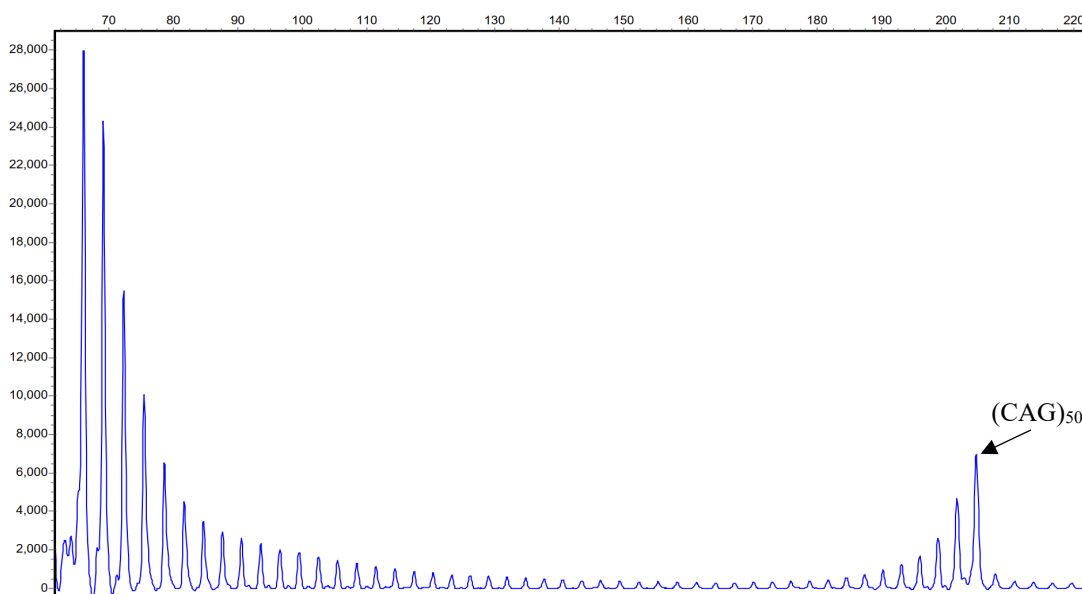
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с ПКО.
2. В верхнем меню выбрать канал «Blue» используя клавишу «Show Dye».
3. Убедиться, что всем пикам ПКО по каналу «Blue» присвоено верное значение аллеля.

Важно!! Панель Syntol_HTT_1 используется для анализа образцов со смесью СП-1, а панель Syntol_HTT_2 используется для СП-2.



Электрофореграмма положительного контрольного образца с генотипом (CAG)50/ (CAG)50 с использованием панели (подсчет количества повторов выполняется автоматически).

Примечание!!! Для определения числа триплетов CAG в маркере HTT не обязательно использовать панель для автоматического подсчета (см. пункт 7 – Интерпретация результатов)

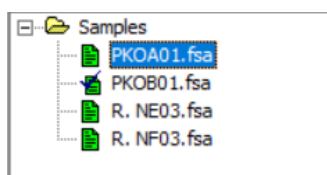


Электрофореграмма положительного контрольного образца с генотипом (CAG)50/(CAG)50 без использования панели (подсчет количества повторов выполняется вручную).

Таблица 3. Аллельное состояние положительного контрольного образца (ПКО)

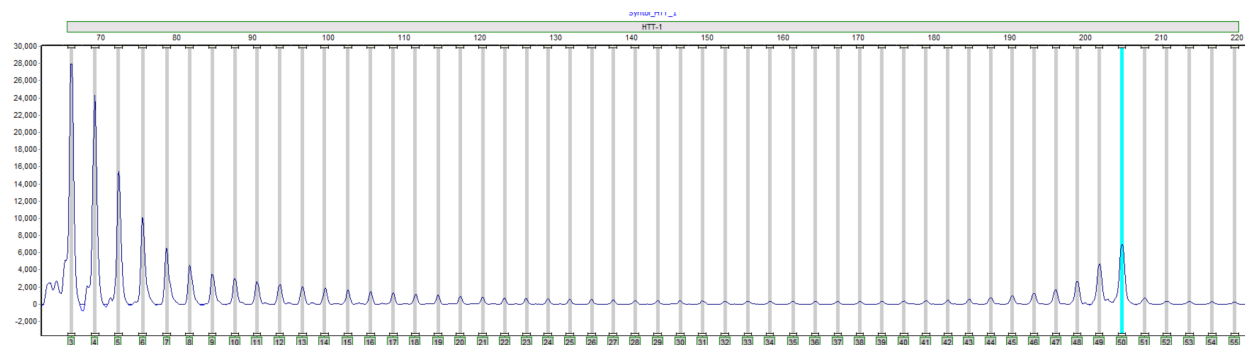
Краситель	Маркер	Аллельное состояние
FAM	HTT	50/50

4. Если присвоенные значения аллелей не соответствует значениям в таблице, необходимо настроить панель.
5. Для настройки панели необходимо в верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor».
6. В списке панелей слева выбрать панель для редактирования. Если используете программу **GeneMarker HID**, то не выбирайте самую верхнюю панель. Нужная панель находится в общем списке по алфавитному порядку.
7. В списке образцов ниже выбрать только положительные контроли (ПКО). С лишних образцов снять галочки выделения нажав дважды левой кнопкой мыши.



8. В окне панели проверить все маркеры на правильность определения аллелей, и 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. Точно так же можно двигать и отдельные аллели внутри маркера. Между красками панели можно переключаться, нажимая на цветное

обозначение краски в верхнем меню. В окне панели возможно такое же масштабирование, как и на графиках образцов в основном рабочем окне.



9. По окончании редактирования панели, необходимо её сохранить, нажав на значок сохранения в верхнем меню. Можно, также, сохранить отредактированную панель под новым названием в меню «File» выбрав «Save As New Panel».

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

6.1.5. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

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

6.1.6. Анализ образца

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу образца.
 2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал используя клавишу «Show Dye»
- С использованием панели – убедиться, что целевым пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля. Без использования панели – подсчитать количество повторов вручную (см. пункт 7 – Интерпретация результатов).

6.2. Анализ данных в Gene Mapper

6.2.1. Импорт файлов для анализа данных

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

1. Запустить программу «GeneMapper» в верхнем меню нажать «Tools» в выпавшем списке выбрать «Panel Manager».
2. В открывшемся окне слева нажать «Panel Manager».
3. В верхнем меню нажать «File» в выпавшем списке выбрать пункт «Import Panels».
4. Выбрать файл панели (Syntol_HTT_1_Panel/Syntol_HTT_2_Panel) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «Import». Выбор панели зависит от используемой СП. Панель Syntol_HTT_1_Panel используется для анализа образцов со смесью СП-1, а панель Syntol_HTT_2_Panel используется для СП-2.
5. Щелкнуть по папке «Syntol-HTT» 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 (Syntol_HTT_1_Bins/Syntol_HTT_2_Bins) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «Import». Закрыть окно «Panel Editor».
8. В верхнем меню нажать «Tools» в открывшемся списке выбрать «GeneMapper Manager».

9. В верхней строке открывшегося окна перейти на вкладку «**Size Standards**» и нажать кнопку «**Import**».
10. Выбрать файл размерного стандарта (СД-450) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».
11. Перейти на вкладку «**Analysis Methods**» и нажать кнопку «**Import**».
12. Выбрать файл метода (Syntol_HTT_methods) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**GeneMapper Manager**».

6.2.2. Анализ данных

1. В программе «**GeneMapper**» в верхнем меню выбрать «**File**», в открывшемся списке выбрать «**Add Samples to Project**».
2. В открывшемся окне выбирать папку с файлами для анализа и нажать кнопку «**Add to list**» внизу под списком папок.
3. Выбранная папка появится в окне справа, внизу нажать кнопку «**Add**».
4. Для образцов выбрать ранее импортированные в программу: «**Panel**» – Syntol_HTT_1_Panel или Syntol_HTT_2_Panel, «**Size Standard**» - СД-450, «**Analysis Method**» - Syntol_HTT_methods.
5. Запустить анализ.

6.2.3. Анализ размерного стандарта

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

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

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

6.2.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

1. Открыть образец ПКО
2. В верхнем меню включить синий канал. Убедиться в том, что целевым пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 4).

Важно!! Панель Syntol_HTT_1 используется для анализа образцов со смесью СП-1, а панель Syntol_HTT_2 используется для СП-2.

Краситель	Маркер	Аллельное состояние
FAM	HTT	50/50

Примечание!!! Для определения числа триплетов CAG в гене *HTT* не обязательно использовать панель для автоматического подсчета (см. пункт 7 – Интерпретация результатов).

3. Если присвоенные значения аллелей не соответствует значениям в таблице, необходимо настроить панель.
4. Для настройки панели необходимо закрыть окно с образцом. В верхнем меню выбрать «Tools» в открывшемся списке выбрать «Panel Manager».
5. В открывшемся окне выбрать папку Syntol-HTT. В ней открыть папку Syntol-HTT, в результате отобразится локус.
6. В верхнем меню нажать кнопку «Add Reference Data».
7. В открывшемся окне внизу слева выбрать папку с данными постановки, выбрать образец ПКО. Нажать «Add To List».
8. Справа появятся выбранная папка и файл. Внизу справа нажать кнопку «Add».
9. В предыдущем окне слева появятся выбранные референсные образцы. Выбрать локус, для редактирования, внизу выбрать образец ПКО.
10. В открывшемся окне отключить все каналы, кроме редактируемого. Внизу нажать на горизонтальную линию диапазона локуса, для отображения границ локуса. Расширить границы локуса и сдвинуть бины локуса, при этом диапазон промежутков между аллелями должен быть сохранен.
11. Проверить, что всем пикам ПКО были присвоены верные значения.
12. После настройки значений локуса нажать кнопку «Apply».
13. Нажать кнопку «ОК».

6.2.5. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

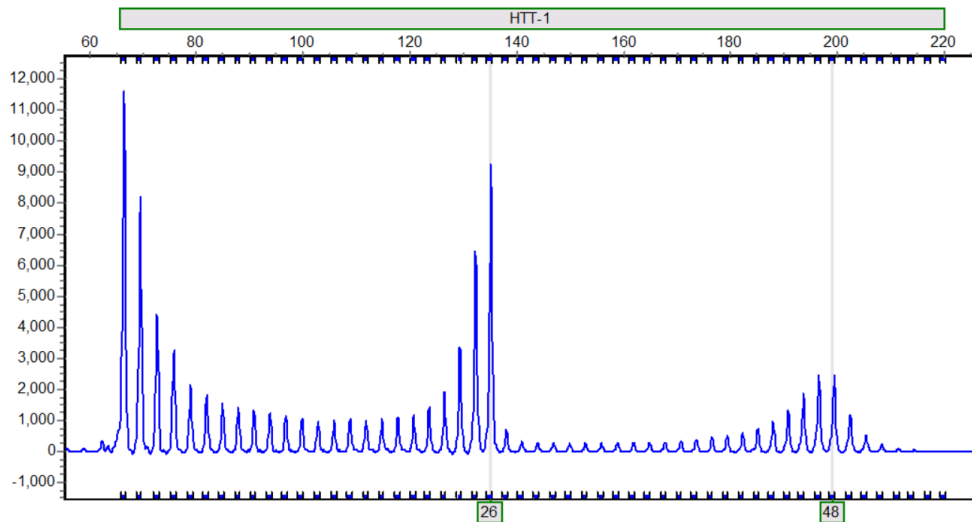
1. Открыть образец ОКО.
2. Убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

6.2.6. Анализ образца

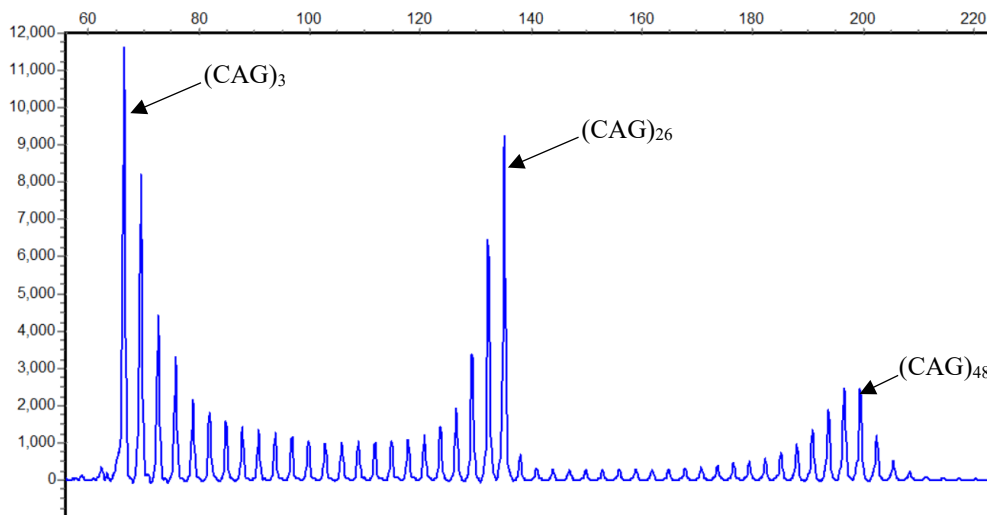
1. Открыть образец.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал.
3. С использованием панели – убедиться, что целевым пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля. Без использования панели – подсчитать количество повторов вручную (см. пункт 7 – Интерпретация результатов).

7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения числа триплетов CAG в гене *HTT* не обязательно использовать панель для автоматического подсчета. Для этого необходимо подсчитать количество пиков, где каждый пик соответствует одному триплету CAG, и прибавить 2, поскольку обратный праймер содержит в своей последовательности три CAG-повтора.

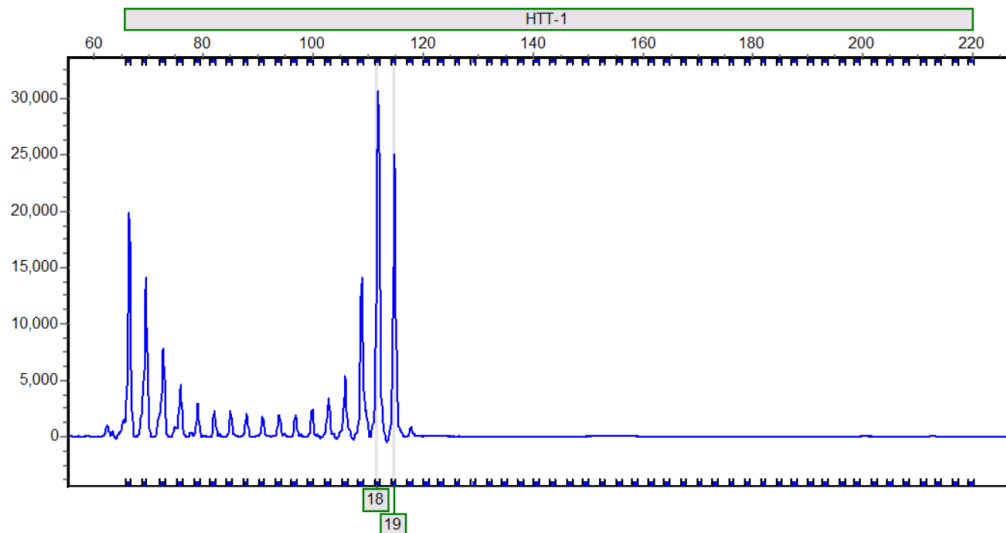


Гетерозиготный образец с генотипом в маркере HTT (CAG)26/(CAG)48 с использованием готовой панели для автоматического подсчета количества повторов.



Гетерозиготный образец с генотипом в маркере HTT (CAG)26/(CAG)48 без использования готовой панели (подсчет количества повторов производится вручную).

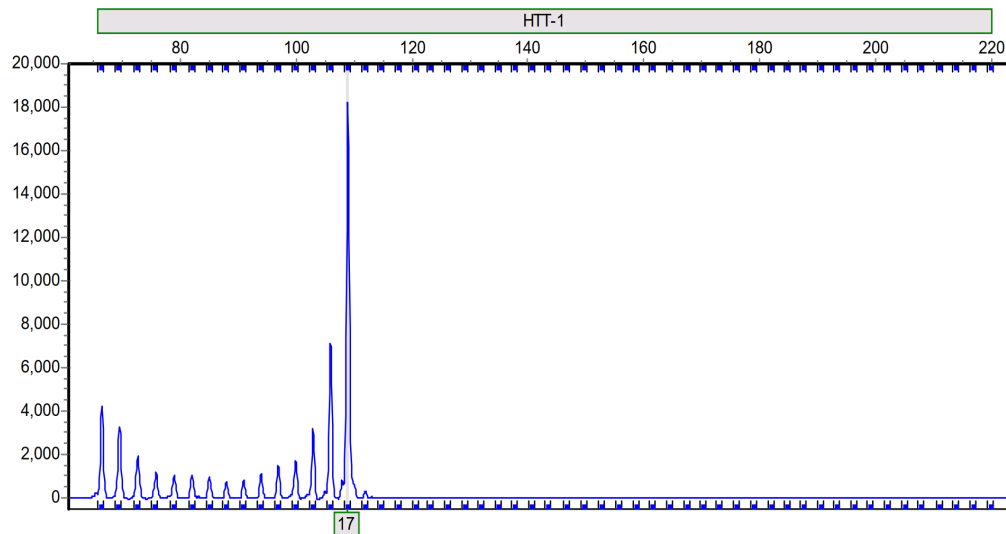
– Лocus, используемый в наборе, тринуклеотидный: аллели локуса отличаются на три нуклеотида. Вследствие этого для каждой аллели характерны статтеры – продукты амплификации, которые обусловлены «проскальзыванием» полимеразы при амплификации микросателлитных участков. Размер статтера будет отличаться от размера целевого аллеля на три нуклеотида. Если в локусе целевые аллели отличаются на один повтор (3 нуклеотида), статтер более длинного аллеля накладывается на целевой пик короткого аллеля, тем самым увеличивая уровень его сигнала.



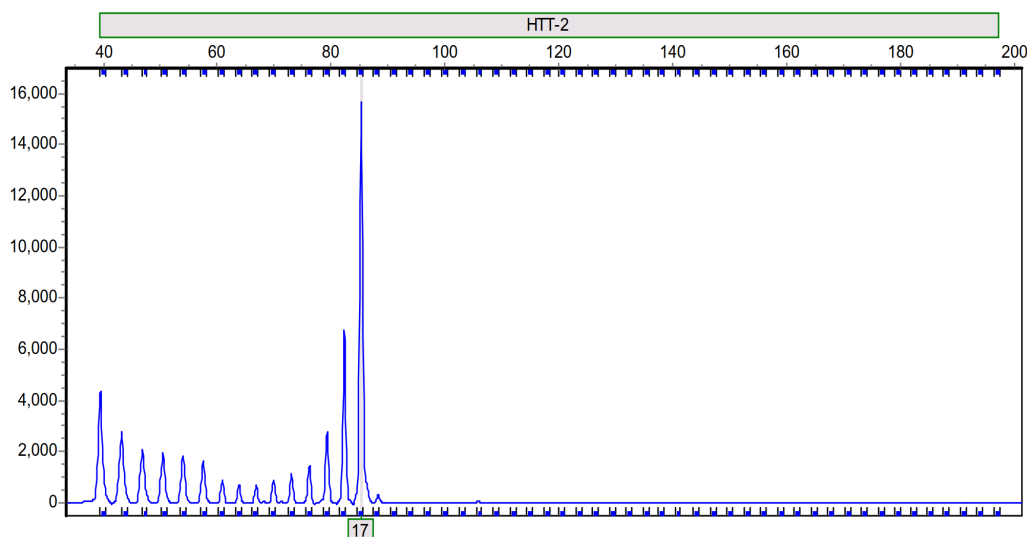
Гетерозиготный образец с генотипом (CAG)18/(CAG)19 в маркере НТТ с наложением статтера аллели (CAG)19 на аллель (CAG)18.

ПРИМЕЧАНИЕ! В ходе исследований, могут встречаться образцы с более редкими аллелями маркера НТТ выходящие за предел панели (>55 повторов). В таком случае следует связаться с разработчиком набора для предоставления расширенной панели.

– При получении гомозиготного результата с СП-1 необходимо повторить анализ со смесью СП-2 для подтверждения или опровержения гомозиготности исследуемого образца.



Гомозиготный образец с генотипом (CAG)17/(CAG)17 в маркере НТТ-1 с использованием СП-1.



Подтвержденный гомозиготный образец с генотипом (CAG)17/(CAG)17 в маркере НТТ-2 с использованием СП-2

Таблица 5. Возможные генотипы в гене *HTT*

Количество CAG-повторов в гене НТТ	Диагностический тест	Прогностический тест	Риск развития для детей
6-26 – нормальная аллель	Болезнь Гентингтона исключена	Болезнь Гентингтона не разовьется	Невысокий риск развития болезни Гентингтона
27-35 – умеренное увеличение	Болезнь Гентингтона очень маловероятна	Маловероятно, что болезнь Гентингтона разовьется	Риск развития БГ (<10%)
36-39 – умеренная экспансия	Диагноз "болезнь Гентингтона" подтвержден. Возможна легкая форма проявлений	Может развиться болезнь Гентингтона со сниженной пенетрантностью	Повышенный риск развития болезни Гентингтона
40 и более – выраженная экспансия	Диагноз "болезнь Гентингтона" подтвержден	Болезнь Гентингтона разовьется	Повышенный риск развития болезни Гентингтона

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