

Gene Profile Sheep L

**Набор реагентов для проведения генотипирования овец по 12-ти микросателлитным
локусам и локусу амелогенина**

Лиофилизированный

ИНСТРУКЦИЯ по применению

Содержание

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	4
1.1. Описание набора	4
1.2. Область применения.....	5
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	6
2.1. Состав набора.....	6
2.2. Количество анализируемых проб	6
2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности.....	6
2.4. Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование ..	6
3. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	7
3.1. Подготовка к проведению реакции амплификации	7
3.2. Подготовка к проведению реакции амплификации из цельной крови.....	7
3.3. Подготовка к проведению реакции амплификации из ушного выщипа	8
3.4. Проведение амплификации.....	8
4. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА НАНОФОР 05	9
4.1. Проведение спектральной калибровки.....	9
4.1.1. Создание набора красителей.....	9
4.1.2. Подготовка раствора спектральной калибровки	9
4.1.3. Запуск спектральной калибровки	10
4.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации.....	11
4.3. Запуск фрагментного анализа.....	11
5. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА АВ3500/АВ3500XL	14
5.1. Проведение спектральной калибровки.....	14
5.1.1. Создание DyeSets	14
5.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора	15
5.1.3. Запуск спектральной калибровки	16
5.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации.....	17
5.3. Запуск фрагментного анализа.....	17
6. АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	18
6.1. Анализ данных в программах GeneMarker и GeneMarker HID.....	18
6.1.1. Импорт файлов для анализа данных	18
6.1.2. Создание проекта анализа данных.....	19
6.1.3. Анализ размерного стандарта.....	21
6.1.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО).....	23
6.1.5. Внесение профиля ПКО в шаблон анализа	27
6.1.6. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	30
6.1.7. Анализ образцов.....	30

6.1.8. Исключение из анализа статтеров и артефактных пиков	30
6.2. Анализ данных в Gene Mapper	32
6.2.1. Импорт файлов для анализа данных	32
6.2.2. Анализ данных.....	34
6.2.3. Анализ размерного стандарта.....	35
6.2.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)	37
6.2.5. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	41
6.2.6. Анализ образца.....	41
7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	42

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание набора

Набор реагентов «Gene Profile Sheep L» предназначен для генетической идентификации и определения родства овец.

В основе работы набора лежит мультиплексная амплификация 12 STR-локусов и локуса амелогенина с последующим анализом длин ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза.

Используемые в наборе праймеры мечены красителями Blue, Green, Yellow, Red (см. таблицу 1). Стандарт длин СД-340 мечен красителем Orange. Использование шести красителей позволяет одновременно детектировать 13 ампликонов и стандарт длин в одном капилляре.

Таблица 1. Характеристика STR-локусов набора GeneProfile Sheep L

Канал детекции	Лocus	Хромосомная локализация	Структура повтора	Диапазон аллелей
Blue	OarFCB20	2	(TG)n	75-115
	AMEL			Y/X
	McM527	5	(TG)n	158-182
	CSRD247	14	(CA)n	205-261
Green	INRA006	1	(CA)n	106-134
	INRA063	14	(AC)n	165-215
	ETH152	5	(AC)n	184-200
Yellow	INRA172	22	(TG)n	126-172
	MAF065	15	(CA)n	115-139
	MAF214	16	(GT)n	175-267
Red	McM042	9	(AC)n	81-107
	INRA005	10	(GT)n	123-155
	INRA023	1	(AC)n	190-224

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации 12 STR-локусов и локуса амелогенина в одной пробирке. Размер амплифицируемых ПЦР-продуктов находится в диапазоне от 115 до 308 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Разделение ампликонов, полученных в результате ПЦР, проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов (например, Нанофор 05).

Для получения полного генотипа исследуемого образца достаточно 10 нанограмм (нг) недеградированной ДНК. Оптимальное количество ДНК, вносимой в реакцию, составляет 10–15 нг. Диапазон концентраций ДНК для проведения амплификации – от 5 до 40 нг в реакцию.

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

Возможно проведение прямой ПЦР:

- 1) С внесением 0,5 мкл цельной крови в приготовленную реакционную смесь.

2) С внесением 5 мкл раствора кровь/Н₂О (2 мкл крови + 200 мкл Н₂О) в приготовленную реакционную смесь.

3) С внесением 2 мкл раствора, полученного при обработке ушного выщипа (время обработки 15 мин) с помощью реагента «ГенПреп» (Синтол, кат. № HG-504/ HG-504p).

1.2. Область применения

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

2.1. Состав набора

№	Наименование	Состав	Объем, мкл	Количество, шт
1	РА	Раствор активатора	1000	2
2	РС	Лиофилизированная реакционная смесь в стрипах (8 x 0,2 мл)	–	12
3	ПКО ♂	Положительный контрольный образец – стабилизированный раствор ДНК	50	1
4	СД-340	Стандарт длин – набор фрагментов известной длины (60, 80, 100, 140, 180, 220, 240, 260, 300, 320, 340)	100	1
5	Н ₂ O	Деионизированная Н ₂ O	1700	1

2.2. Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение ста реакций, включая контрольные образцы.

2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности

Температура хранения – от +4 до +20°C.

Транспортирование – при температуре +4 до +20°C.

Срок годности набора – 12 месяцев.

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

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

3. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

3.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

Для приготовления рабочей реакционной смеси необходимо в каждую пробирку стрипов, содержащих лиофилизированную смесь, добавить компоненты согласно таблице 2.

Таблица 2. Расчет рабочей реакционной смеси

Реагент	мкл на реакцию
РА	20
ДНК	1-5
Н₂О	до 25

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

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

1. Пробирку с **РА** перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
2. Внести в пробирки стрипов, содержащих лиофилизированную смесь, по **20 мкл РА**.
3. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в пробирки (на стенку) от **1 до 5 мкл** исследуемых образцов, общий объем довести до **25 мкл** деионизированной Н₂О.
4. В одну из пробирок стрипа с лиофилизированной смесью внести **20 мкл РА** и **5 мкл** деионизированной Н₂О (отрицательный контрольный образец), в еще одну внести **20 мкл РА**, **5 мкл ПКО** (положительный контрольный образец).
5. Закрывать ПЦР-пробирки.
6. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

3.2 Подготовка к проведению реакции амплификации из цельной крови

Набор реагентов Gene Profile Sheep L позволяет провести реакцию амплификации из цельной крови напрямую, минуя стадию выделения ДНК.

Первый способ:

1. Внести в пробирку стрипа с активированной лиофилизированной смесью **5 мкл** деионизированной Н₂О.
2. Добавить **0,5 мкл** цельной крови.
3. Перемешать содержимое на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
4. В одну из пробирок стрипа с активированной лиофилизированной смесью внести **5 мкл** деионизированной Н₂О (отрицательный контрольный образец), в еще одну внести **5 мкл ПКО** (положительный контрольный образец).
5. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

Второй способ:

1. Внести в пробирку **200 мкл** деионизированной Н₂О.
2. Добавить **2 мкл** цельной крови.
3. Перемешать содержимое на вортексе и центрифугировать для сброса капель.

4. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести в пробирки с активированной лиофилизированной смесью **5 мкл** раствора кровь/Н₂О.
5. В одну из пробирок стрипа с активированной лиофилизированной смесью внести **5 мкл** деионизированной Н₂О (отрицательный контрольный образец), в еще одну внести **5 мкл ПКО** (положительный контрольный образец).
6. Закрывать ПЦР-пробирки.
7. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

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

3.3 Подготовка к проведению реакции амплификации из ушного выщипа

1. В пробирку **2 мл** поместить **5–10 мг** навески ткани ушного выщипа.
2. Добавить **300 мкл** реагента «ГенПреп» (кат. № HG-504/ HG-504p) и провести обработку согласно инструкции.
3. Пробирку с **РА** перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
4. Внести по **20 мкл РА** в нужное количество ПЦР-пробирок.
5. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести от **1 до 3 мкл** раствора, полученного при обработке ушного выщипа.
6. Общий объем довести до **25 мкл** деионизированной Н₂О.
7. В одну из пробирок стрипа с активированной лиофилизированной смесью внести **5 мкл** деионизированной Н₂О (отрицательный контрольный образец), в еще одну внести **5 мкл ПКО** (положительный контрольный образец).
8. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

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

3.4 Проведение амплификации

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

Температура	Время	ДНК, кровь, ушные выщипы
95 °С	3 мин	31 цикл
95 °С	10 сек	
60 °С	1 мин	
70 °С	20 сек	
60 °С	20 мин	

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

4. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (НАНОФОР 05)

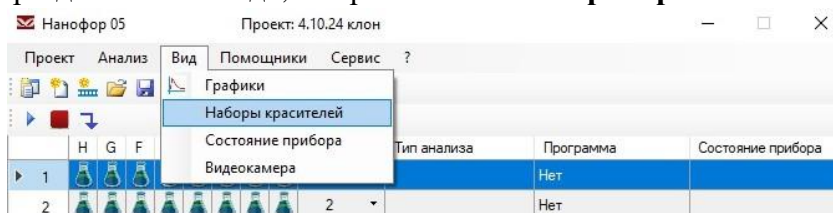
Для получения полного STR-профиля проводится фрагментный анализ – электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «Gene Profile Sheep L».

4.1. Проведение спектральной калибровки

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

4.1.1. Создание набора красителей

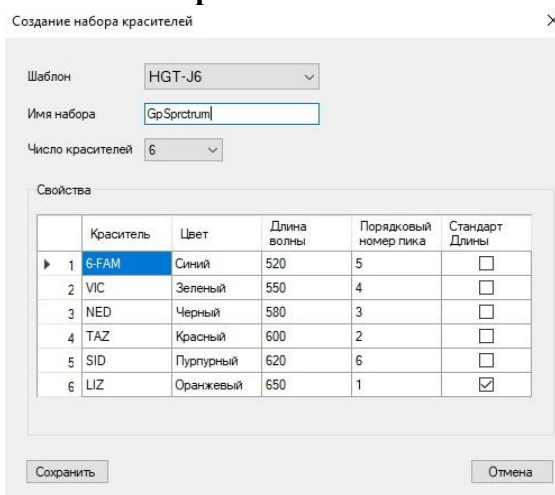
1. Открыть управляющую программу **Нанофор 05**.
2. Открыть раздел меню «Вид», выбрать в нем «Наборы красителей».



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



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



4.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

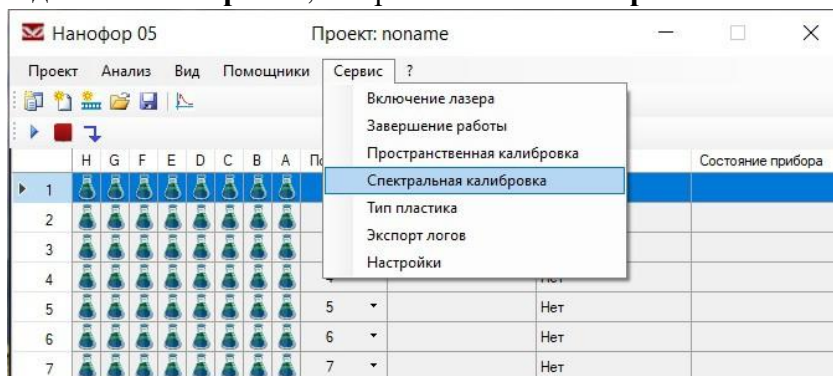
1. В отдельной пробирке смешать **Ди-формаид** и раствор **GpSpectrum** по протоколу:

Ди-формаид	80 мкл
GpSpectrum	8 мкл

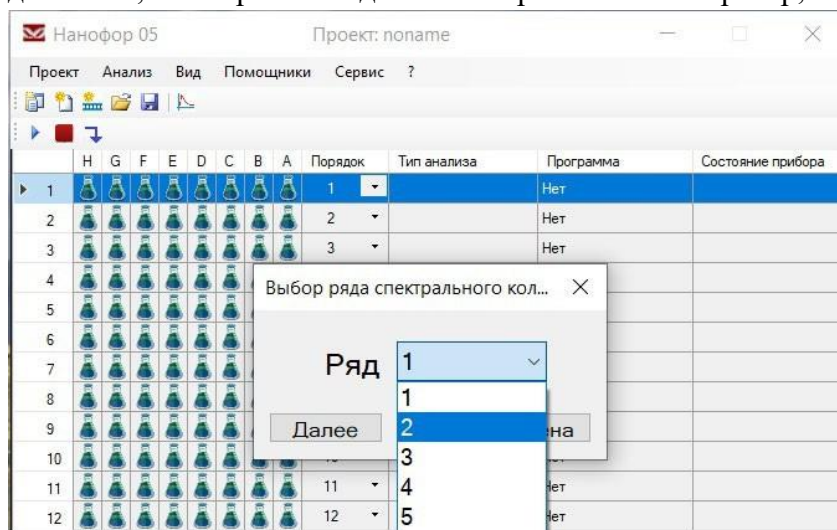
2. Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить **10 мкл** рабочего раствора в лунки.

4.1.3. Запуск спектральной калибровки

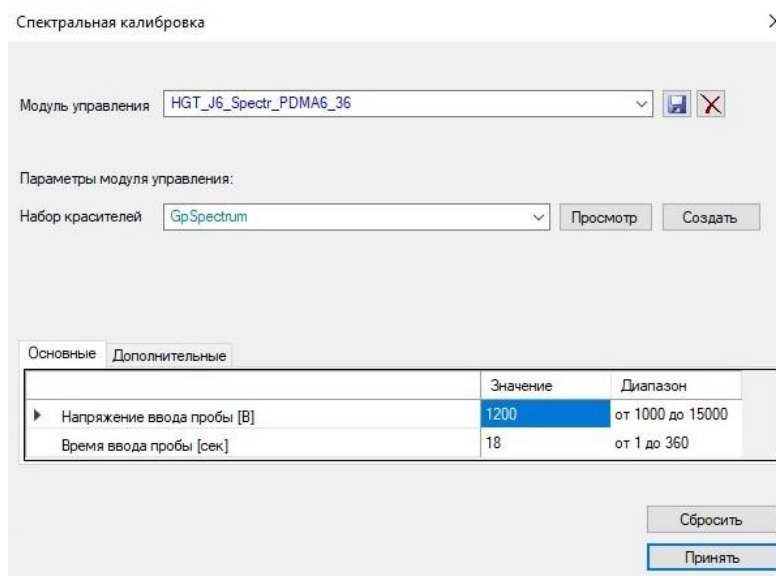
1. Открыть раздел меню «Сервис», выбрать в нем «Спектральная калибровка».



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



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



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

4.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

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

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

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

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

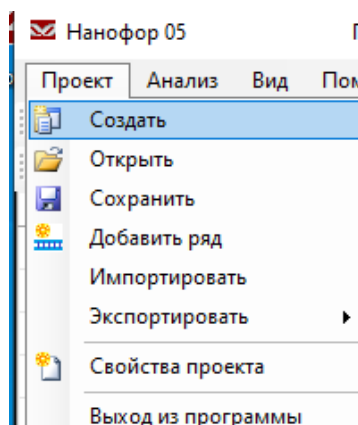
ВАЖНО!!! Инъекция образцов происходит из восьми лунок ряда одновременно. Не допускается запуск прибора, если в анализируемом ряду имеется хотя бы одна незаполненная лунка! В пустые лунки, не содержащие образцы, следует внести по 10 мкл формамида.

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

4.3. Запуск фрагментного анализа

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

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



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

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

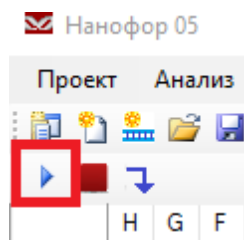
4. В случае если установлен модуль «**Syntol – GP Sheep**», использовать его. Если модуль не установлен, использовать следующие значения: тип анализа – «**Фрагментный**», модуль управления – «**FA_450**», набор красителей – «**GpSpectrum**».

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

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

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

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



5. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (AB3500/AB3500XL)

5.1. Проведение спектральной калибровки

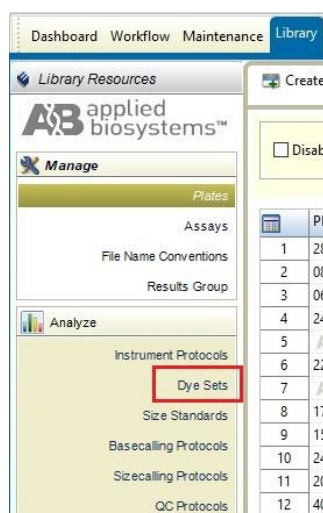
Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с шестичетверным калибратором «GP Spectrum».

5.1.1. Создание DyeSets

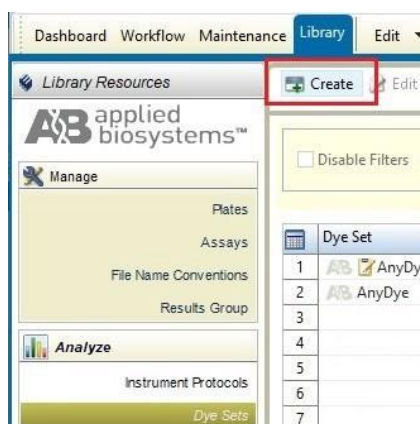
1. Открыть программу **Data Collection Software**.
2. Кликнуть по иконке «**Library**» в левом верхнем углу окна.



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



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



5. В открывшемся окне в поле «**Dye Set Name**» написать «**GpSpectrum**», в поле «**Chemistry**» из выпадающего списка выбрать «**Matrix Standard**», а в поле «**Dye Set Template**» из выпадающего списка выбрать «**J6**».

6. На вкладке «Parameters» в разделе «Matrix Condition Number Upper Limit» установить значение – 11.0.

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

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

5.1.2. Подготовка раствора спектрального калибратора

1. В отдельной пробирке смешать Ди-формаид и раствор «GP Spectrum» по протоколу:

	AB3500	AB3500XL
Ди-формаид	80 мкл	240 мкл
«GP Spectrum»	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 стрипованные пробирки.

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

4. Установить 96-луночный планшет или стрипованные пробирки с раствором калибратора «GP Spectrum» в прибор для капиллярного электрофореза.

5.1.3. Запуск спектральной калибровки

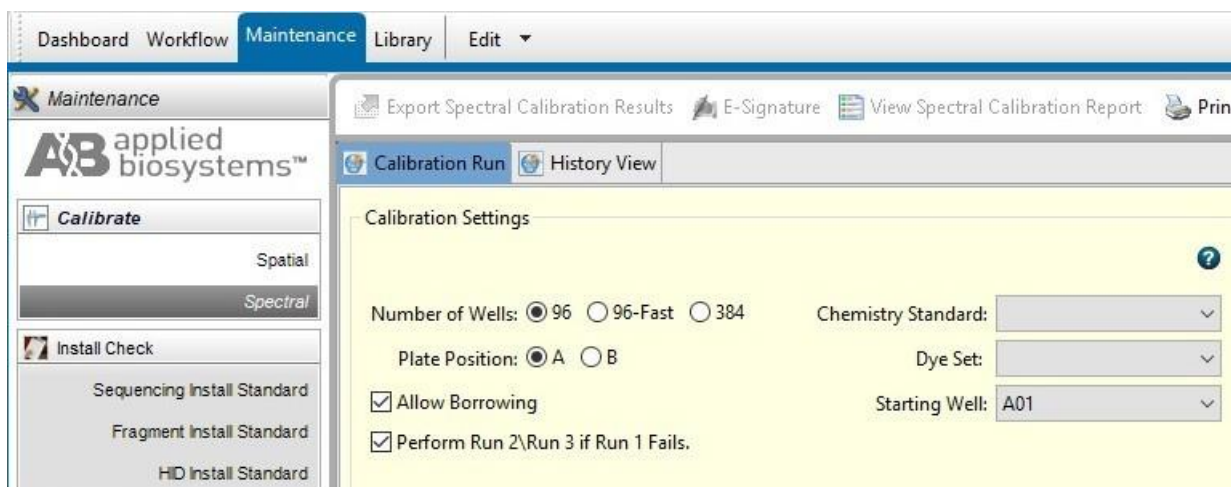
1. Открыть программу Data Collection Software. Кликнуть по кнопке «Maintenance» в верхней строке или «Wizard».



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 «GP Spectrum», 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.

- После завершения калибровки нажать кнопку «**Ассепт**» в нижней части окна.

5.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

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

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

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

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

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.

- 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:

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

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

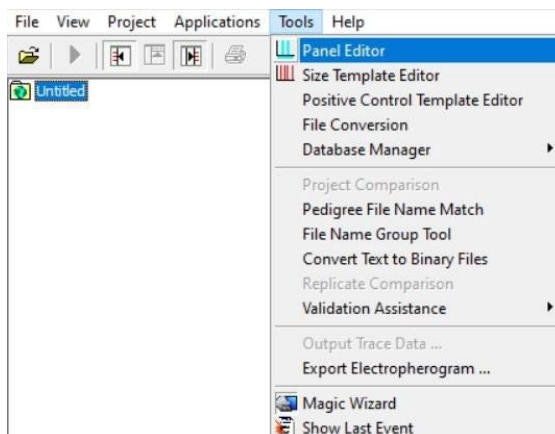
6. АНАЛИЗ ДАННЫХ

6.1. Анализ данных в программах GeneMarker и GeneMarker HID

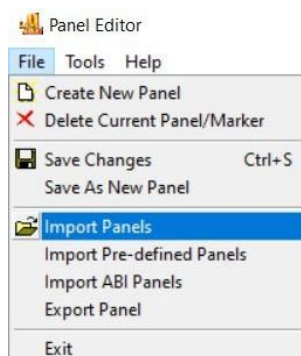
6.1.1. Импорт файлов для анализа данных

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

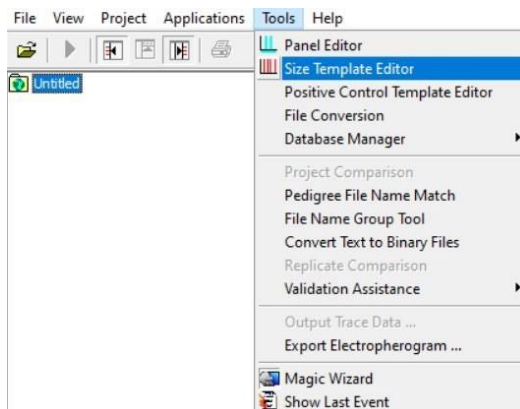
1. Запустить программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в выпавшем списке «**Panel Editor**».



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



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



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



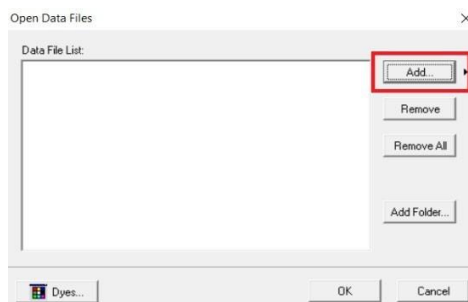
7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (СД-340) и подгрузить его в программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**.
8. Закрыть окно «**Size Template Editor**».

6.1.2. Создание проекта анализа данных

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



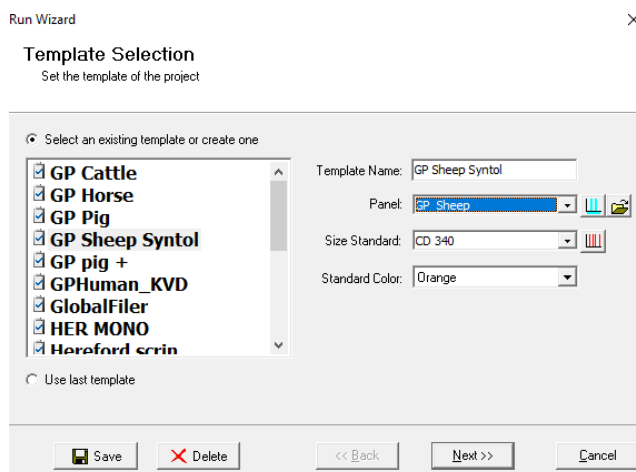
2. Нажать «**Add**» и загрузить нужные файлы.



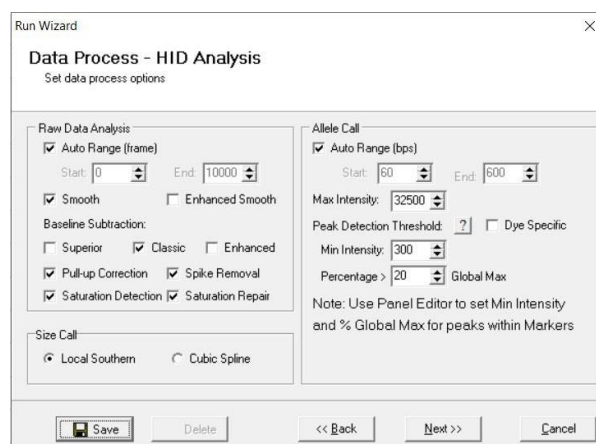
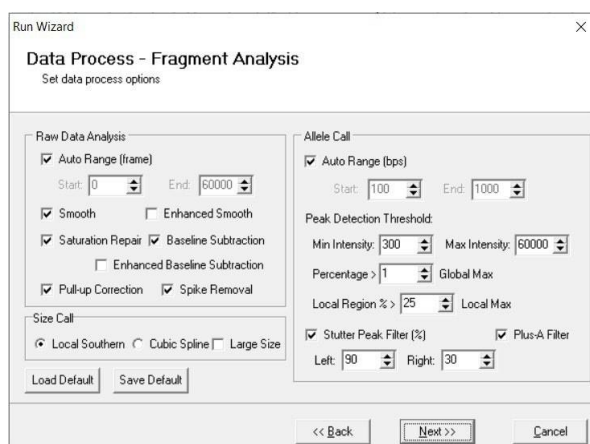
3. После добавления файлов нажать «ОК».
4. Кликнуть по «Run» в окне «Run». Или запустить анализ, нажав на клавишу «Run Project» в верхнем меню.



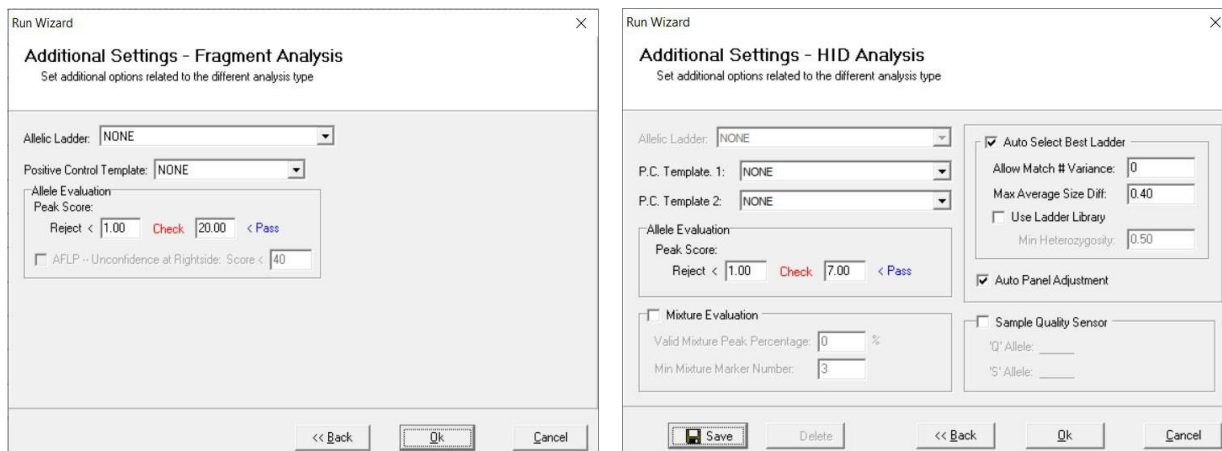
5. В открывшемся окне «Run Wizard» из списка шаблонов выбрать шаблон (template) для модификации, нажать на него левой кнопкой мыши. Для программы **GeneMarker** в графе «Analysis Type» выбрать тип анализа «Fragment», в **GeneMarker HID** такой опции нет. В графе «Panel» выбрать панель «Gp_Sheep», в графе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



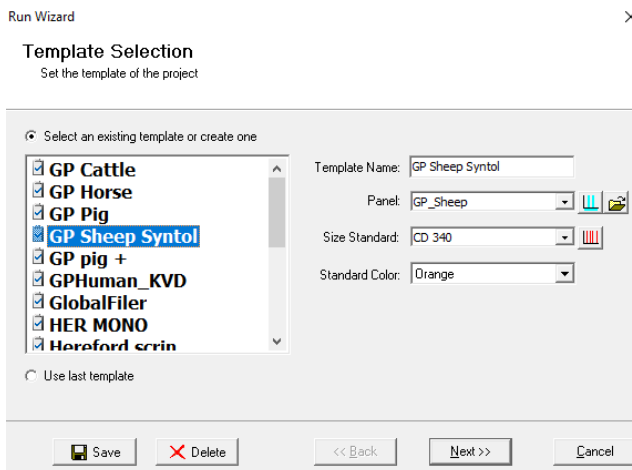
6. В следующем окне выбрать настройки в соответствии с указанными на скриншотах – для **GeneMarker** слева и **GeneMarker HID** справа. Нажать «Next».



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



8. В открывшемся первом окне «**Run Wizard**» еще раз проверить все настройки и нажать «**Save**». Теперь в списке шаблонов появится новый шаблон анализа для работы с набором **Gene Profile Sheep**, для последующих анализов можно выбирать его без дополнительных корректировок.



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

6.1.3. Анализ размерного стандарта

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



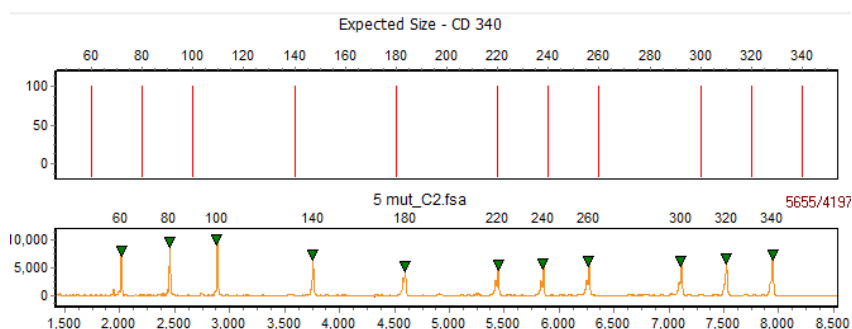
2. В открывшемся окне «**Calibration Charts**» проверить все образцы по списку и убедиться, что оценка качества размерного стандарта не ниже 96 баллов из 100. Если это верно для всех образцов, то дальнейшие действия не требуются, окно можно закрыть.

N...	Sample Name	Sc...
1	OKO_G2.fsa	97
2	PKO_E2.fsa	97
3	Sheep_POS_E3.fsa	97
4	Sheep_POS_F3.fsa	97

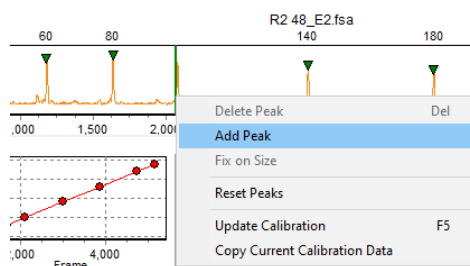
3. Если для каких-то образцов оценка качества размерного стандарта ниже 96 баллов, его нужно проверить, и, возможно, переподписать. Для этого в списке образцов выбрать нужный образец нажатием левой кнопки мыши.

N...	Sample Name	Sc...
1	OKO_G2.fsa	90
2	PKO_E2.fsa	90
3	Sheep_POS_E3.fsa	90
4	Sheep POS F3.fsa	90

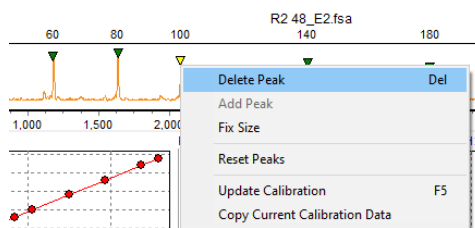
4. Верхний график справа – это виртуальный размерный стандарт, построенный программой для проверки, на него нужно ориентироваться визуально. График ниже – размерный стандарт выбранного образца. Нужно убедиться, что паттерн подписанных пиков нижнего графика совпадает с паттерном пиков верхнего графика.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



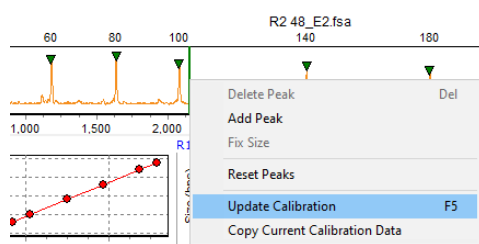
5. Если на каких-то пиках треугольников не хватает, нужно их проставить, нажав правой кнопкой мыши на нужный пик и выбрав в выпавшем меню «Add Peak». Для удобства график можно масштабировать.



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

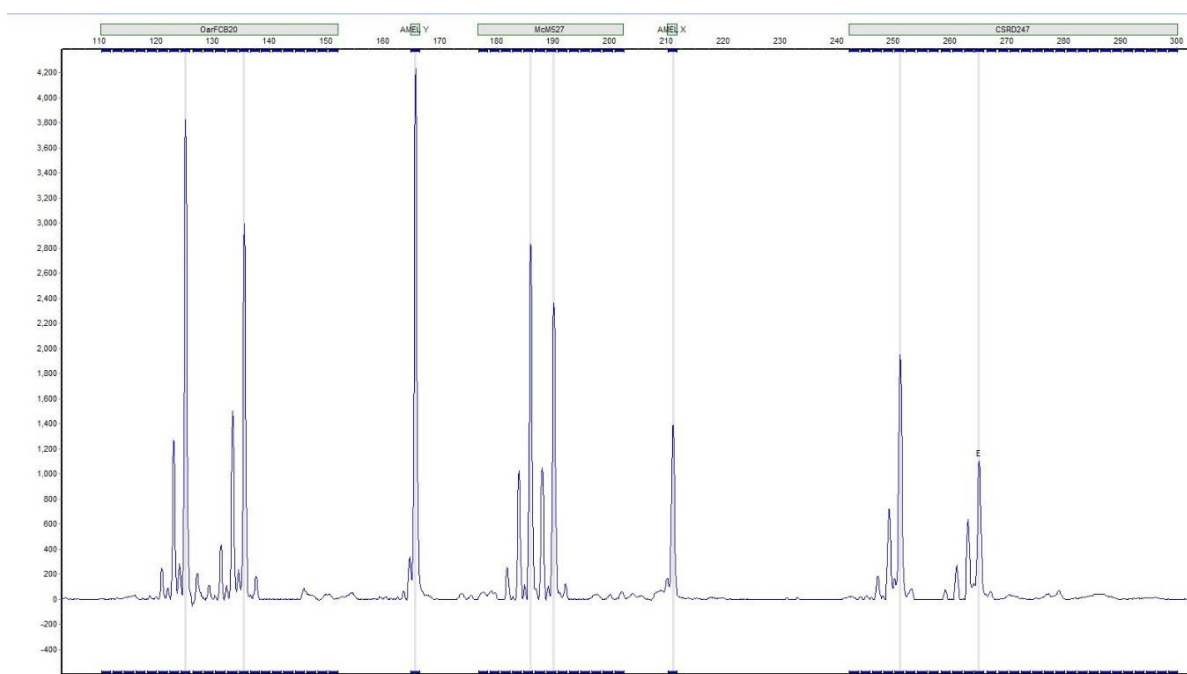


7. По окончании корректировки пиков стандарта выбранного образца нужно правой кнопкой мыши нажать на свободное поле между пиками и в выпадающем меню выбрать «**Update Calibration**». Повторить процедуру для всех образцов, качество размерного стандарта которых ниже 96 баллов. Закрыть окно «**Calibration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

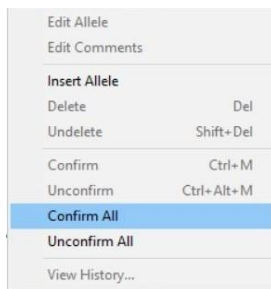


6.1.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

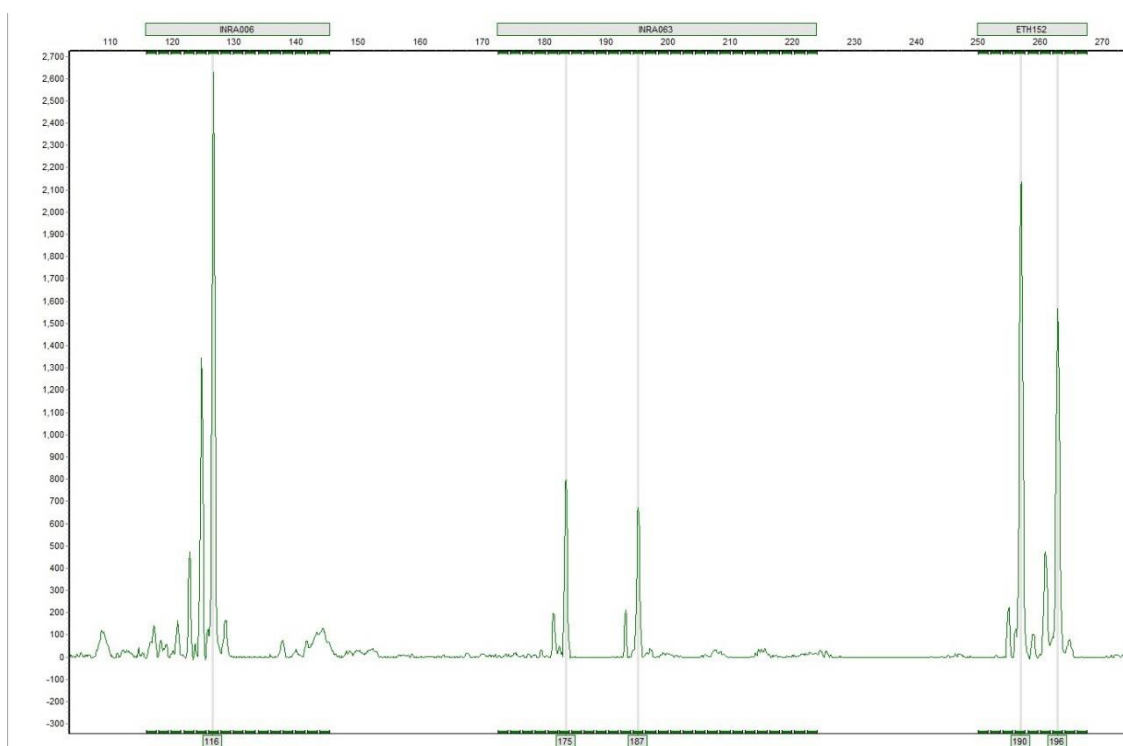
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с **ПКО**.
2. В верхнем меню выбрать канал «**Blue**», используя клавишу «**Show Dye**».
3. Убедиться, что всем пикам **ПКО** по каналу «**Blue**» присвоено верное значение аллеля. Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши,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



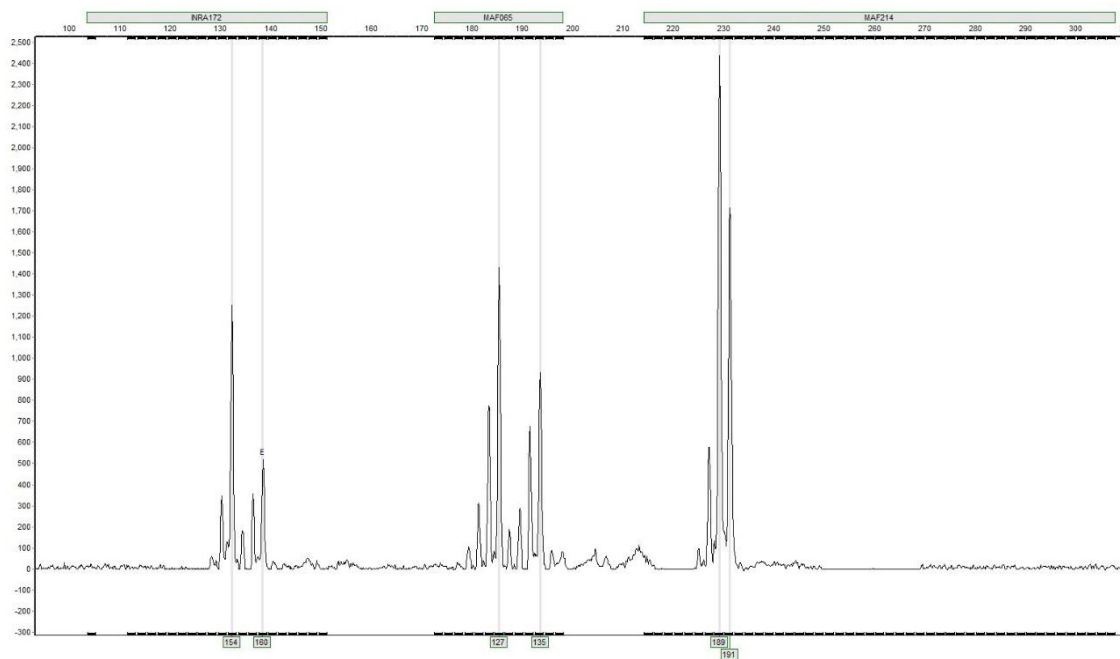
4. Если остались желтые или красные подписи пиков, их нужно принять при условии, что они верные. Правой кнопкой мыши нажать на пустое поле графика, без пиков, и в выпавшем меню выбрать «**Confirm all**».



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



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



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

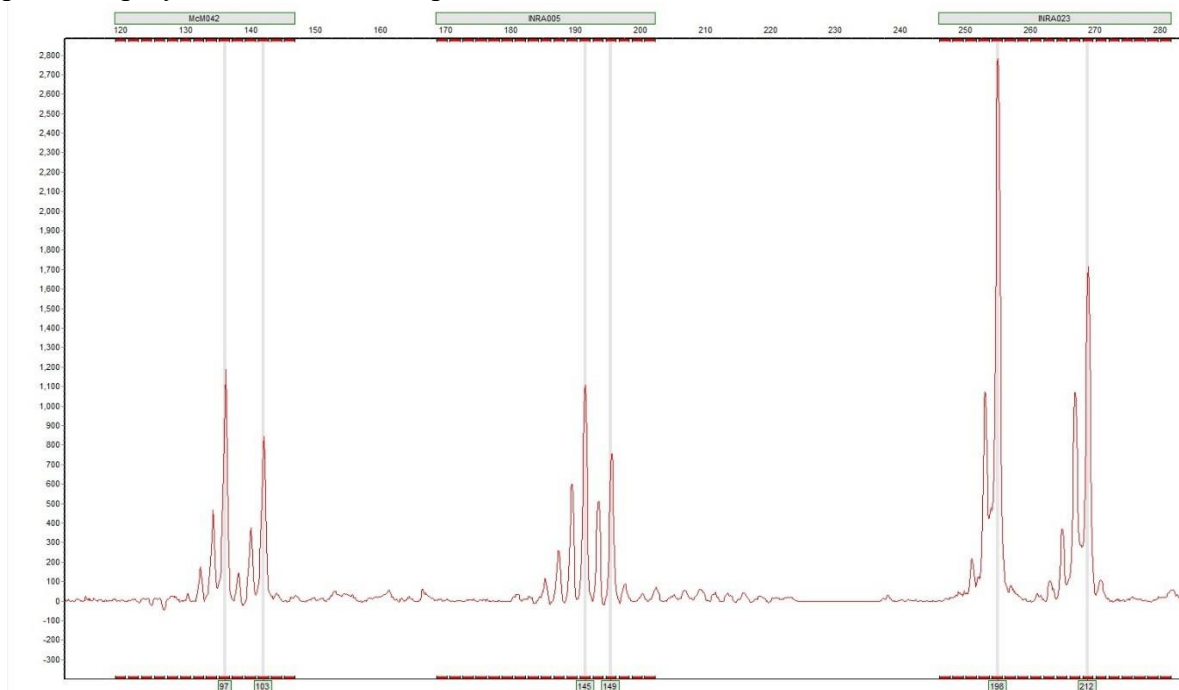
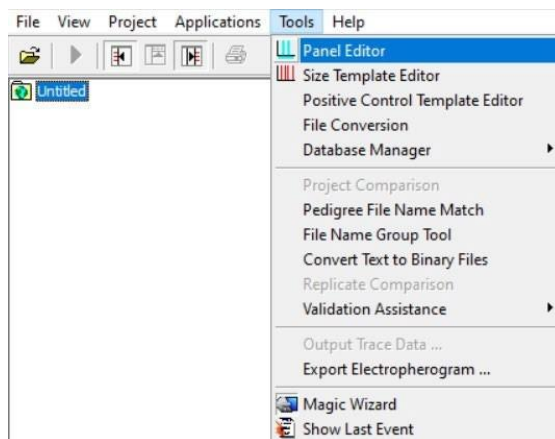


Таблица 3. Аллельное состояние положительного контрольного образца (ПКО)

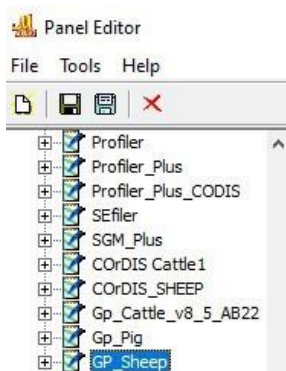
Канал детекции	Локус	Хромосомная локализация	Аллельное состояние
Blue	OarFCB20	2	89/99
	AMEL	Y/X	Y/X
	McM527	5	166/170
	CSRD247	14	213/227
Green	INRA006	1	116
	INRA063	14	175/187
	ETH152	5	190/196
Yellow	INRA172	22	154/160
	MAF065	15	127/135
	MAF214	16	189/191
Red	McM042	9	97/103
	INRA005	10	145/149
	INRA023	1	198/212

11. Если присвоенные значения аллелей не соответствуют значениям в таблице, необходимо настроить панель.

12. Для настройки панели необходимо в верхнем меню выбрать «**Tools**», в выпавшем списке «**Panel Editor**».



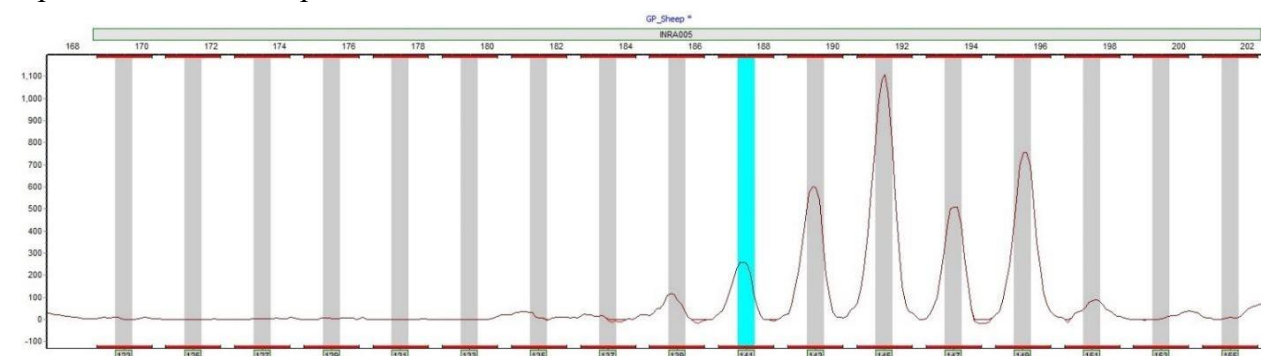
13. В списке панелей слева выбрать панель для редактирования. Если используете программу **GeneMarker HID**, то не выбирайте самую верхнюю панель. Нужная панель находится в общем списке по алфавитному порядку.



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



15. В окне панели проверить все маркеры на правильность определения аллелей. Маркеры, в которых аллели ПКО определились неверно, сдвинуть до правильного положения. Для передвижения маркера нажать и удерживать клавишу «Shift», нажать и удерживать левой кнопкой мыши название маркера на полосе сверху и мышью передвинуть маркер в нужное положение. 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.



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

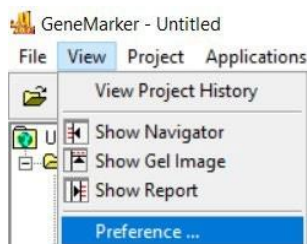
17. Далее нужно закрыть окно «Panel Editor» и заново перезапустить анализ проекта, в стандартном шаблоне выбрав отредактированную панель вместо обычной.

6.1.5. Внесение профиля ПКО в шаблон анализа.

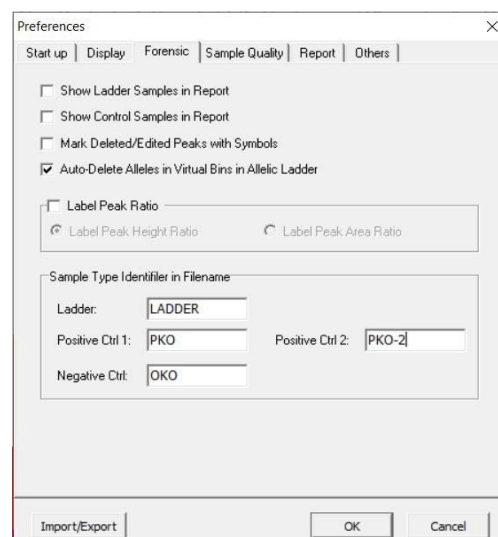
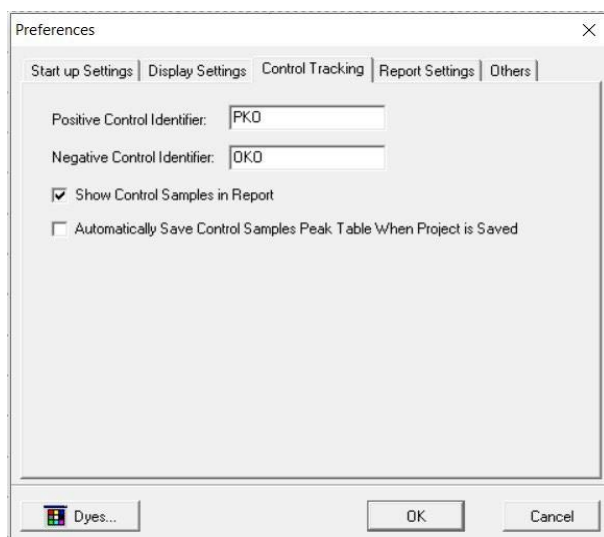
1. Нужно определиться со стандартным названием для положительных контролей в лаборатории, например «ПКО». Таким образом, все образцы ПКО в каждом проекте

должны именоваться «**PKO**». То же самое для отрицательных контролей.

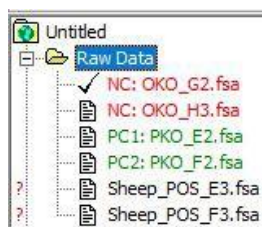
2. В верхнем меню выбрать «**View**», в выпавшем списке «**Preferences**».



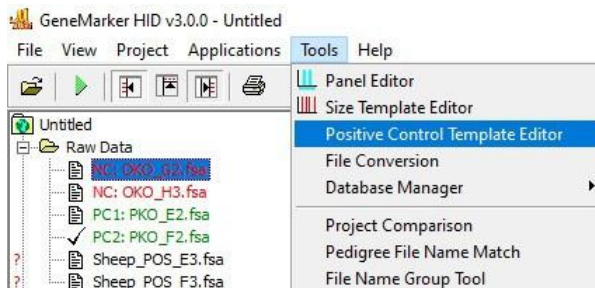
3. В открывшемся окне «**Preferences**» открыть вкладку «**Control Tracking**» для **GeneMarker** или вкладку «**Forensic**» для **GeneMarker HID**. В поле «**Positive Control Identifier**» ввести стандартное наименование для положительного контроля (**PKO**), а в поле «**Negative Control Identifier**»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



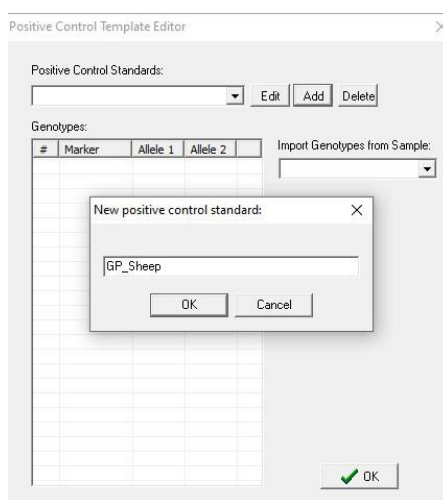
4. Теперь программа будет определять **PKO** и **OKO** в проекте автоматически. Если при загрузке каких-то образцов контроля не определились, нужно еще раз проверить их стандартные наименования в окне «**Preferences**». Также любому образцу в проекте можно принудительно назначить статус **PKO** или **OKO**,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



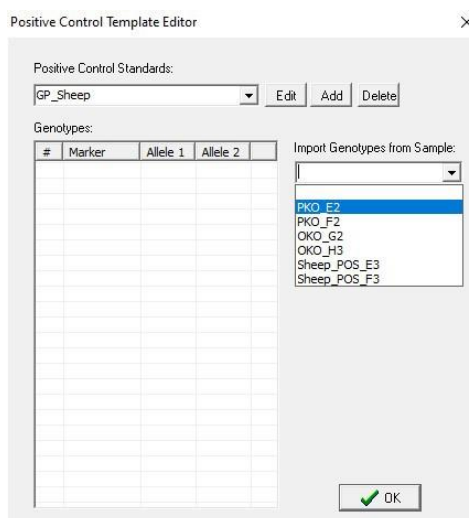
5. В верхнем меню программы выбрать «**Tools**», в выпавшем списке «**Positive Control**



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



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

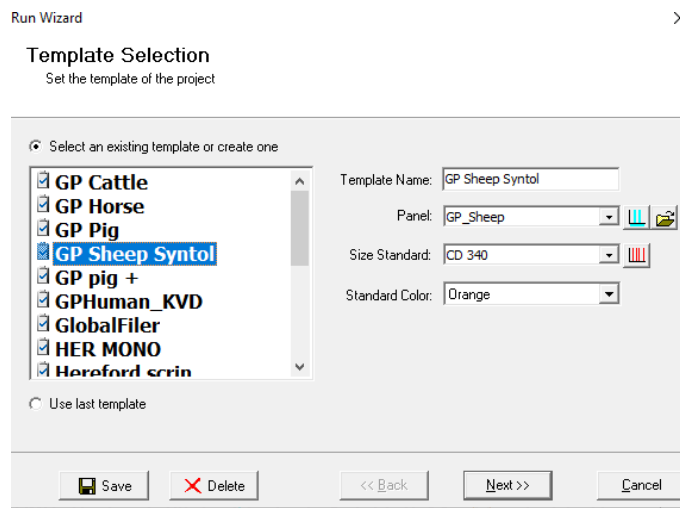


8. В открывшемся окне нажать «Да». Далее нажать «OK» внизу окна.

9. Запустить анализ, нажав на клавишу «Run Project» в верхнем меню. В открывшемся окне «Run Wizard» из списка выбрать нужный шаблон (**Syntol GP Sheep**), два раза нажать «Next». В графе «Positive Control Template»/ «P. C. Template 1» выбрать подходящий

положительный контроль в соответствии с названием, которое было дано ему в пункте 6. Два раза нажать «**Back**» и вернуться к первому окну шаблона.

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



6.1.6. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

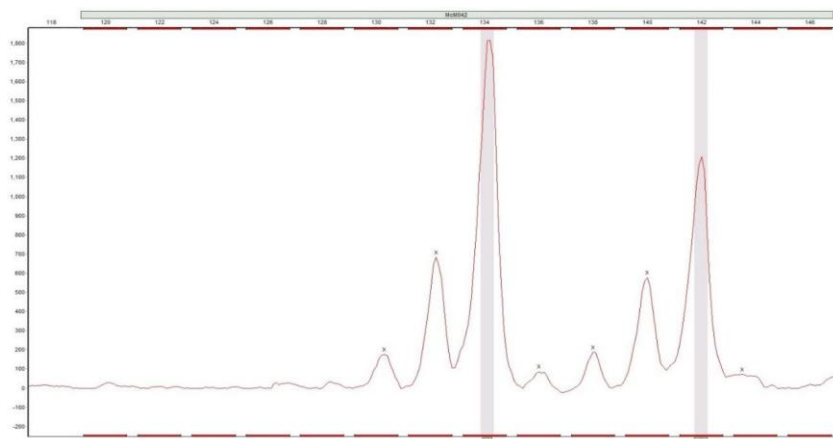
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с **ОКО**.
2. Убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

6.1.7. Анализ образцов

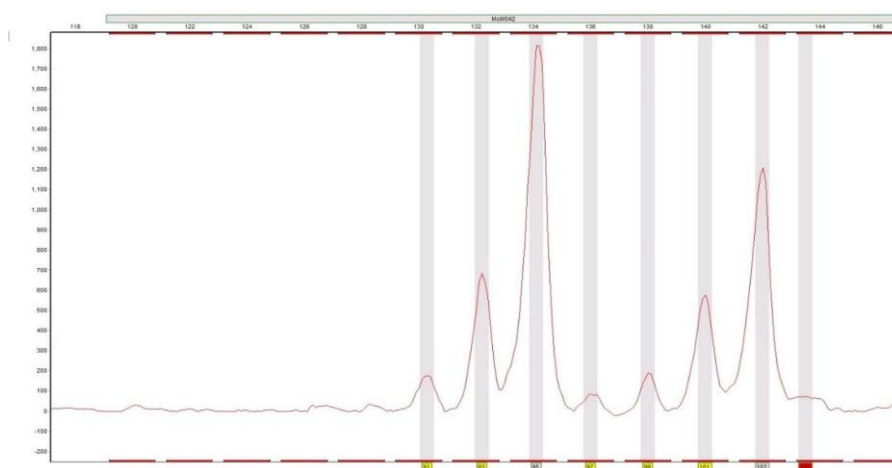
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу образца.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал, используя клавишу «**Show Dye**». Убедиться, что всем пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля.

6.1.8. Исключение из анализа статтеров и артефактных пиков

Микросателлитные локусы, представленные в наборе, несут динуклеотидные повторы, что приводит к образованию высоких статтеров (побочные продукты амплификации, связанные с «проскальзыванием» полимеразы). Они могут достигать до 90% величины основного пика. А в случае наличия двух соседних аллелей в локусе сигнал статтера длинной аллели суммируется с сигналом основного пика короткой аллели, что приводит к дисбалансу по высоте аллелей.

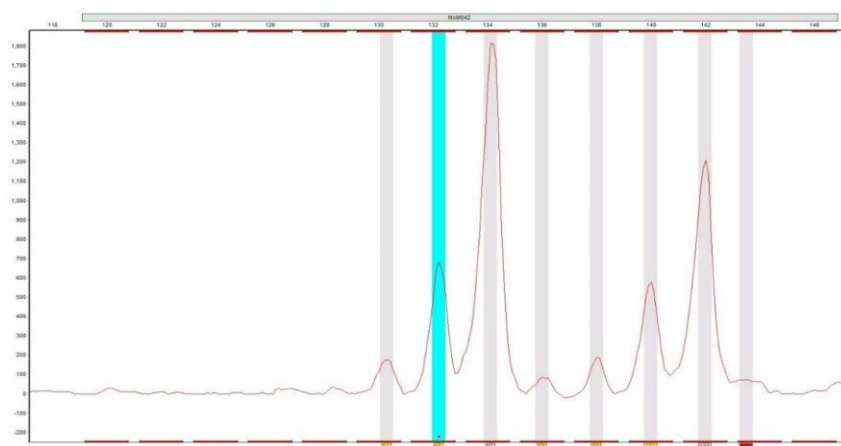


Также возможно присутствие артефактных пиков, связанных с постановкой амплификации напрямую (минуя стадию выделения ДНК).

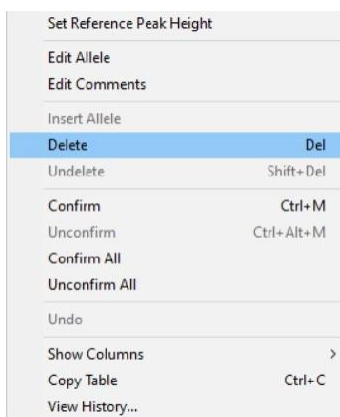


Для исключения из анализа статтеров и артефактных пиков нужно:

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



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

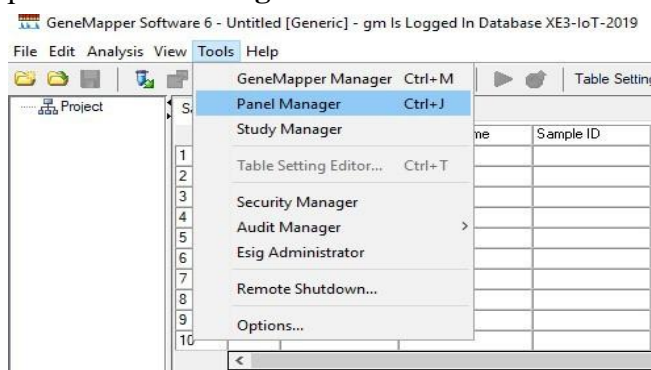


6.2. Анализ данных в Gene Mapper

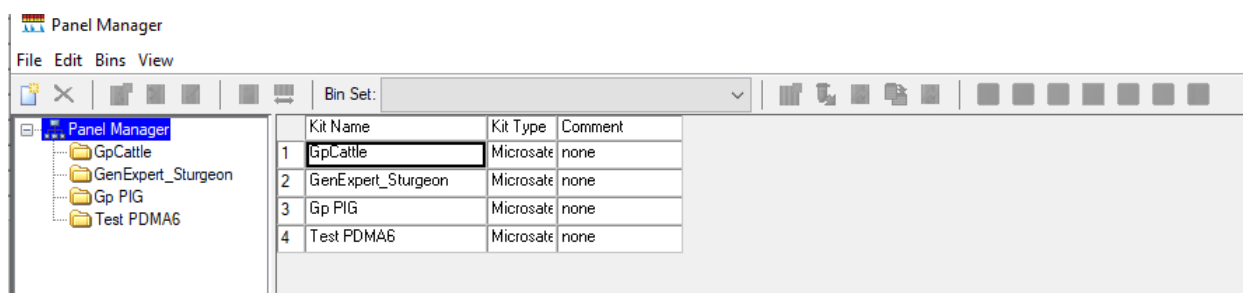
6.2.1. Импорт файлов для анализа данных

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

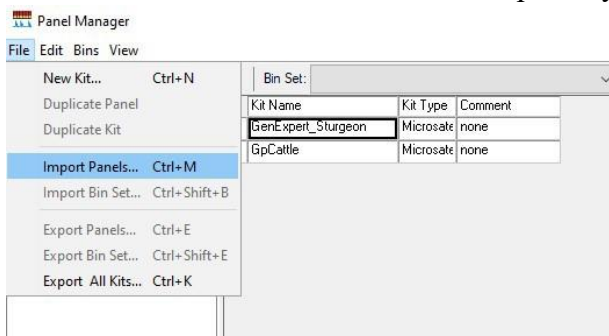
1. Запустить программу **GeneMapper Software 6**, в верхнем меню нажать «**Tools**», в выпавшем списке выбрать «**Panel Manager**».



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

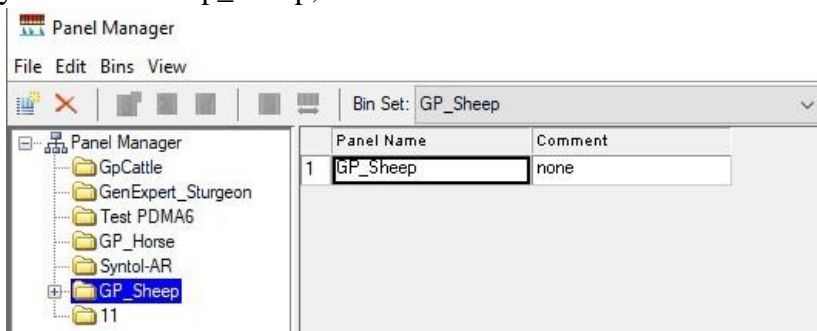


3. В верхнем меню нажать «**File**», в выпавшем списке выбрать пункт «**Import Panels**».



4. Выбрать папку с файлом панели (Gp_Sheep) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».

5. Щелкнуть по папке Gp_Sheep, появившейся в списке «**Panel Manager**»



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



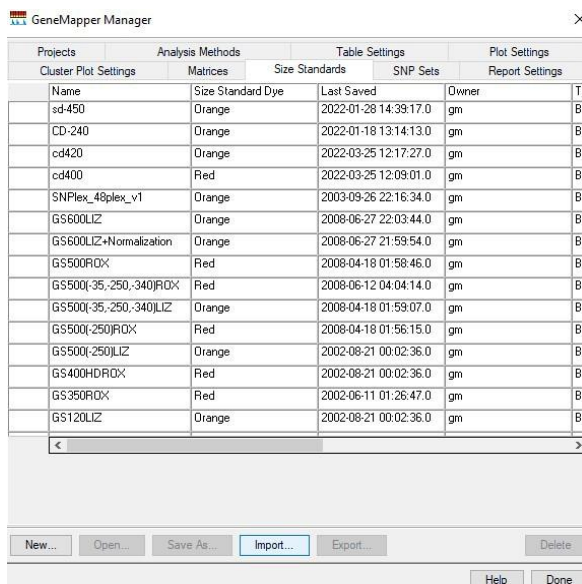
7. Выбрать папку с файлом бинов (GpSheep_bins) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**Panel Editor**».

8. В верхнем меню нажать «**Tools**», в открывшемся списке выбрать «**GeneMapper**»



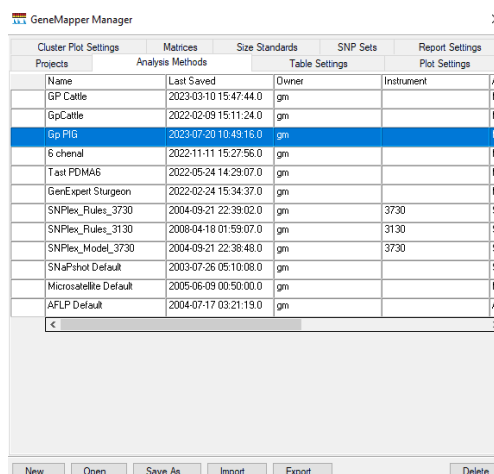
Manager».

9. В верхней строке открывшегося окна перейти на вкладку «**Size Standards**» и нажать кнопку «**Import**».



10. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (**СД-340**) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».

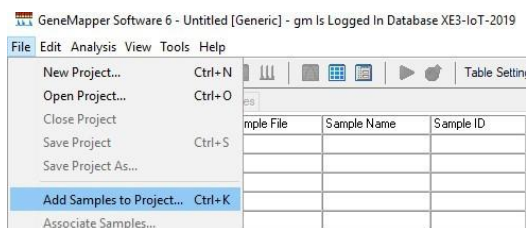
11. Перейти на вкладку «**Analysis Methods**» и нажать кнопку «**Import**».



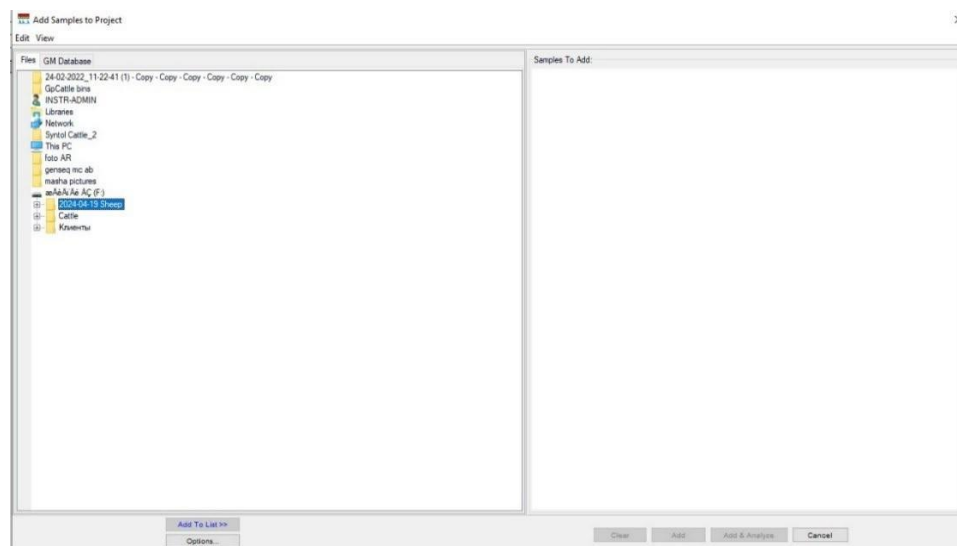
12. Выбрать папку с файлом метода (**Gp Sheep_method**) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**GeneMapper Manager**».

6.2.2. Анализ данных

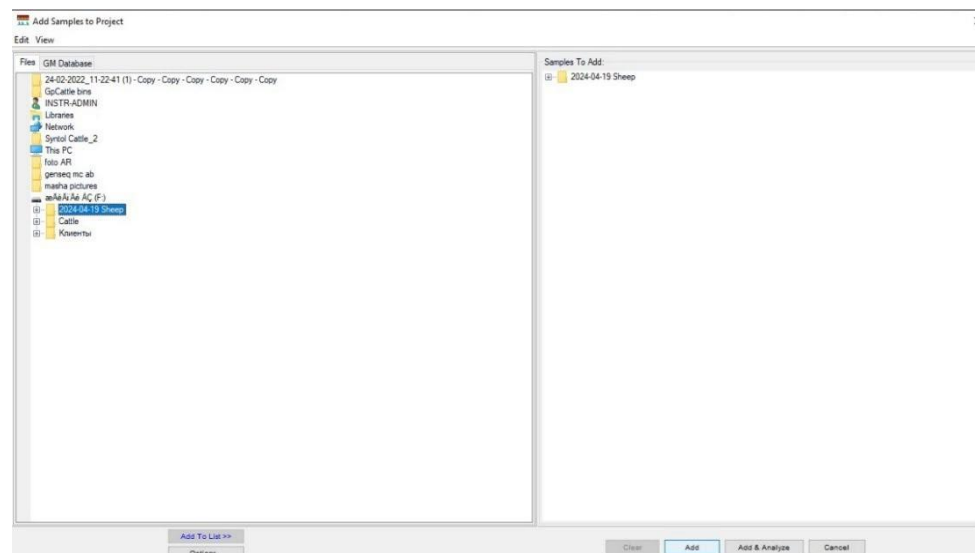
1. В программе **GeneMapper Software 6** в верхнем меню выбрать «**File**», в открывшемся списке выбрать «**Add Samples to Project**».



В открывшемся окне выбрать папку с файлами для анализа и нажать кнопку «**Add to list**» внизу под списком папок.



3. Выбранная папка появится в окне справа, внизу нажать кнопку «**Add**».



4. Для образцов выбрать ранее импортированные в программу: «**Panel**» – **Gp_Sheep**», «**Size Standard**» - **СД-340**, «**Analysis Method**» - **Gp Sheep_method**.
Запустить анализ.

6.2.3. Анализ размерного стандарта

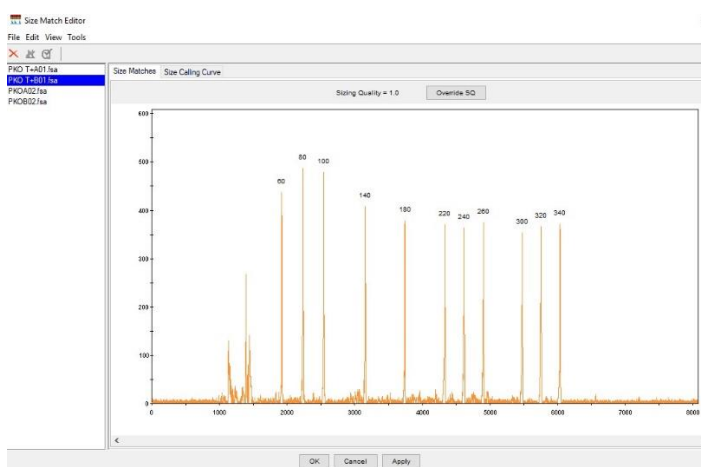
1. Необходимо убедиться, что у всех образцов правильно подписан размерный стандарт.

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

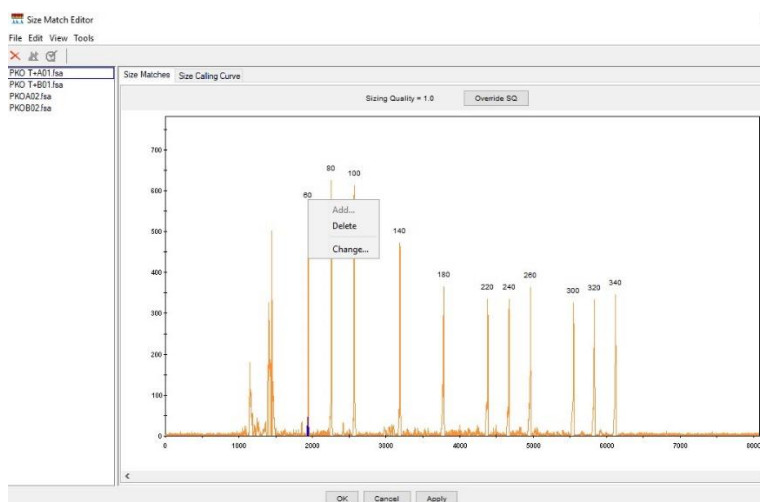
vWell	SE	SGO	ARNM	SFNF	MNF	SNF	SOS	SQ
A07				■	■	■	▲	●
B07				■	■	■	▲	●
C07				■	■	■	▲	●
D07				■	■	■	▲	●

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

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



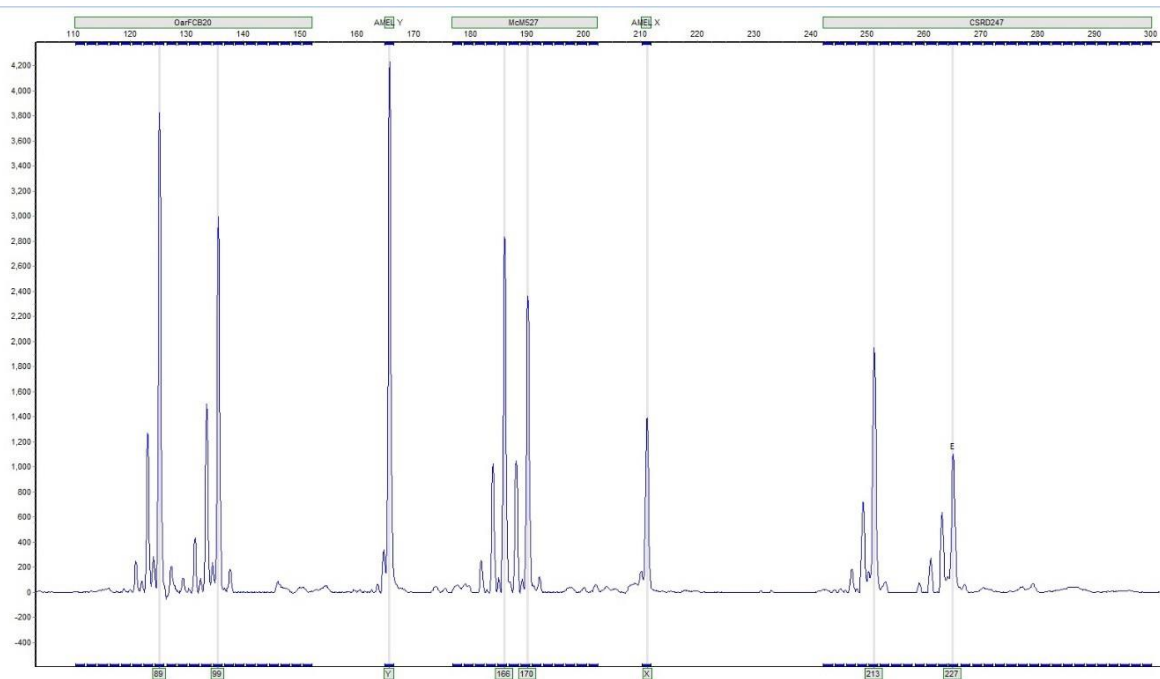
4. Неправильно подписанный пик можно удалить или переименовать, нажав на него правой кнопкой мыши. Неподписанный пик также можно подписать.



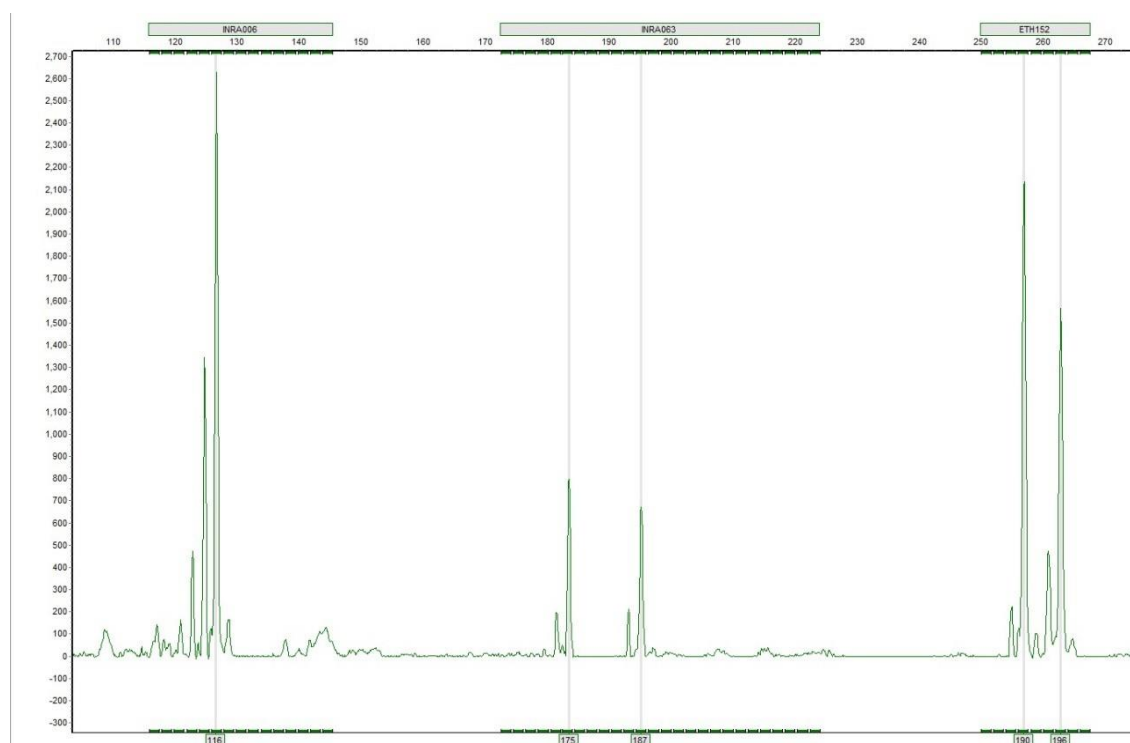
5. По окончании редактирования размерного стандарта нужно нажать кнопку внизу «**Apply**», затем «**OK**». После проверки и исправления всех образцов окно «**Size Match Editor**» можно закрыть. Далее можно приступить к анализу ПКО.

6.2.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

1. Открыть образец ПКО
2. В верхнем меню отключить все каналы, кроме синего. Убедиться в том, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 3). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «DELETE».

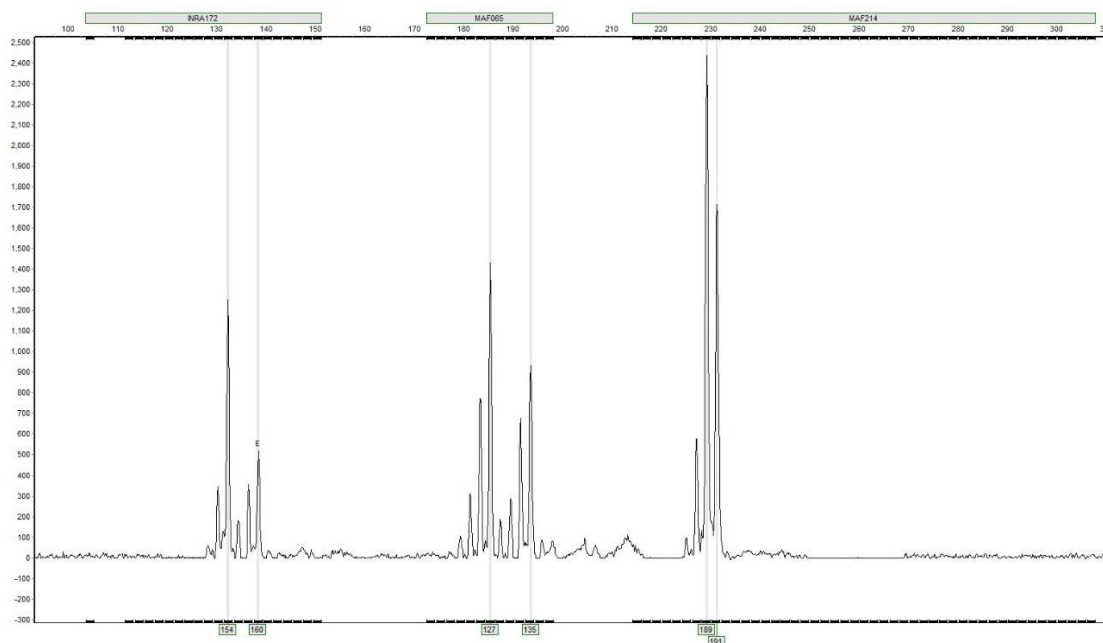


3. В верхнем меню отключить все каналы, кроме зеленого. Убедиться в том, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 3). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «DELETE».

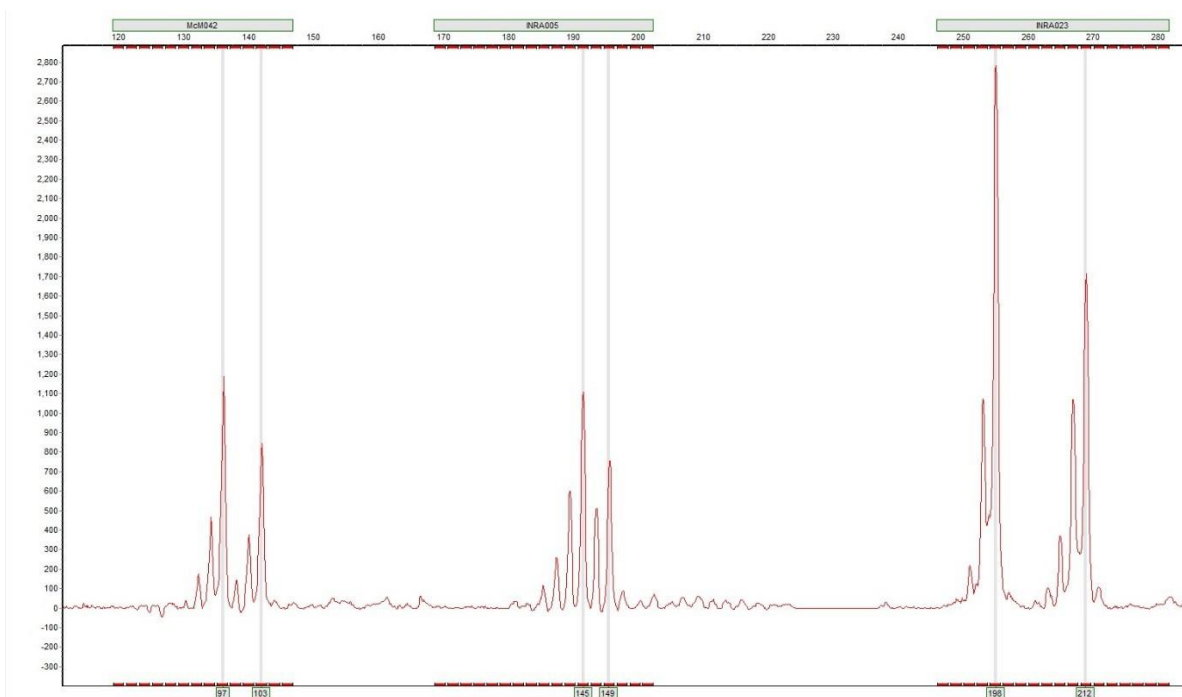


4. В верхнем меню отключить все каналы, кроме желтого. Убедиться в том, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см.

таблицу 3). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «**DELETE**».

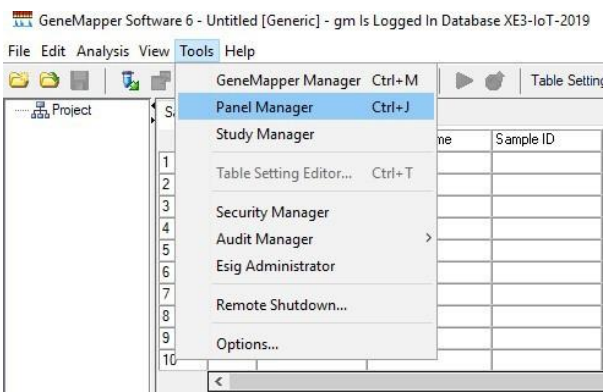


5. В верхнем меню отключить все каналы, кроме красного. Убедиться в том, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния. Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «**DELETE**».

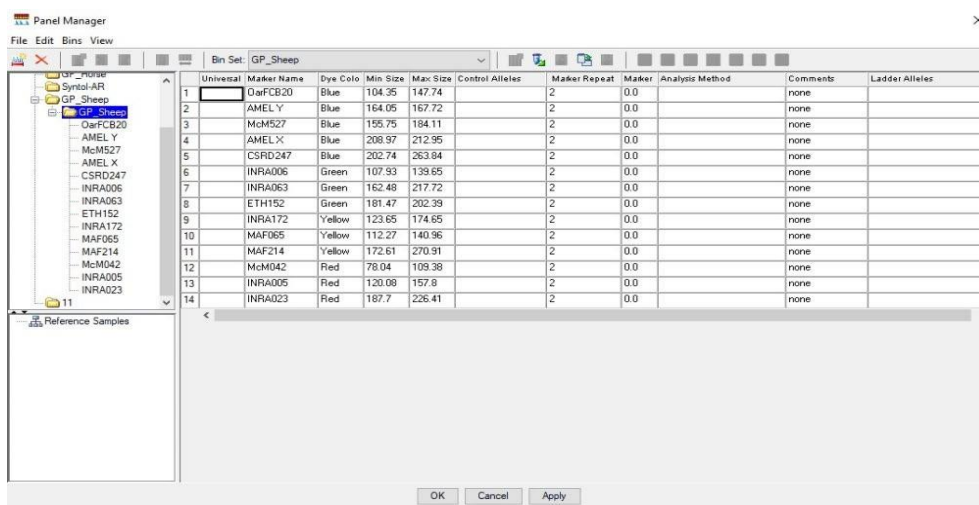


6. Если присвоенные значения аллелей не соответствуют значениям в таблице, необходимо настроить панель.

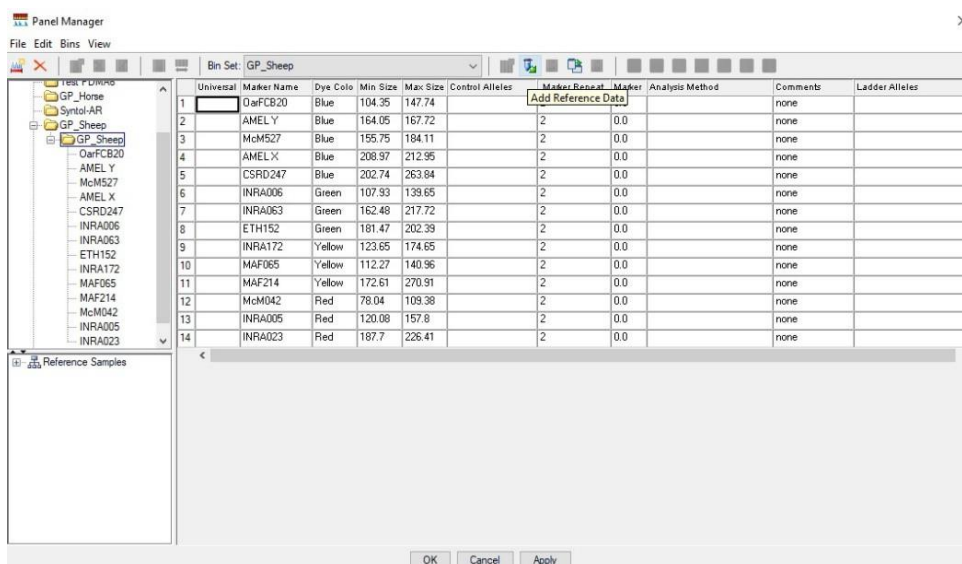
7. Для настройки панели необходимо закрыть окно с образцом. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в открывшемся списке выбрать «**Panel Manager**».



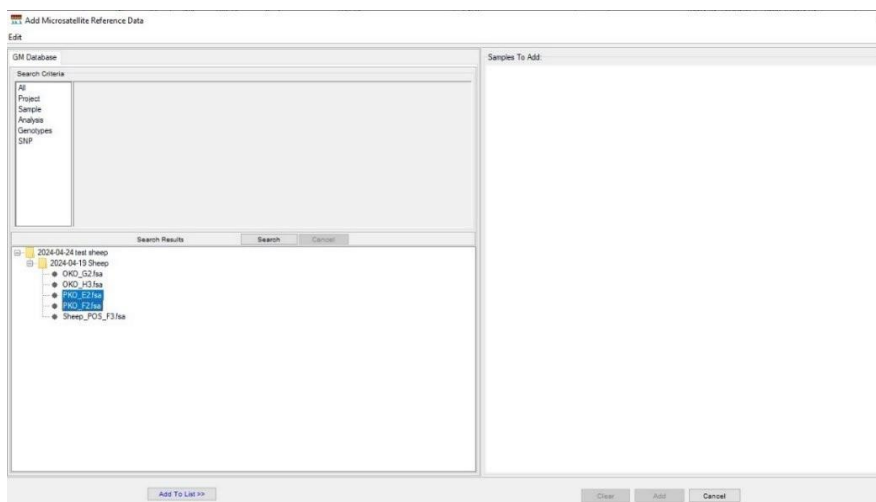
8. В открывшемся окне выбрать папку **Gp Sheep**. В ней открыть папку **Gp Sheep**, в результате отобразится список всех локусов.



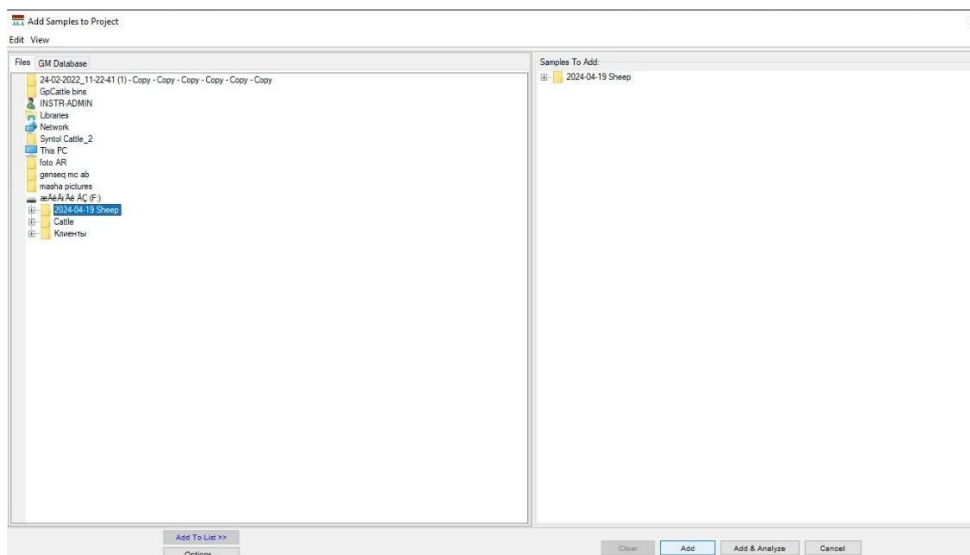
9. В верхнем меню нажать кнопку «Add Reference Data».



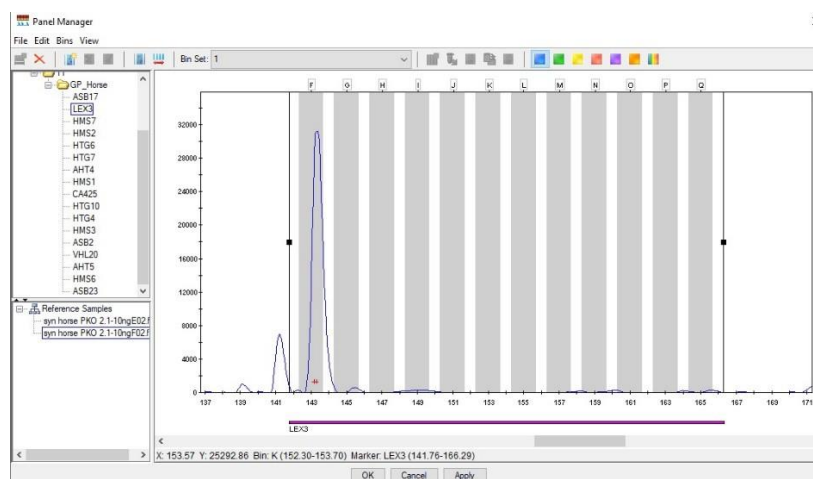
10. В открывшемся окне внизу слева выбрать папку с данными постановки, выбрать образец ПКО. Нажать «Add To List».



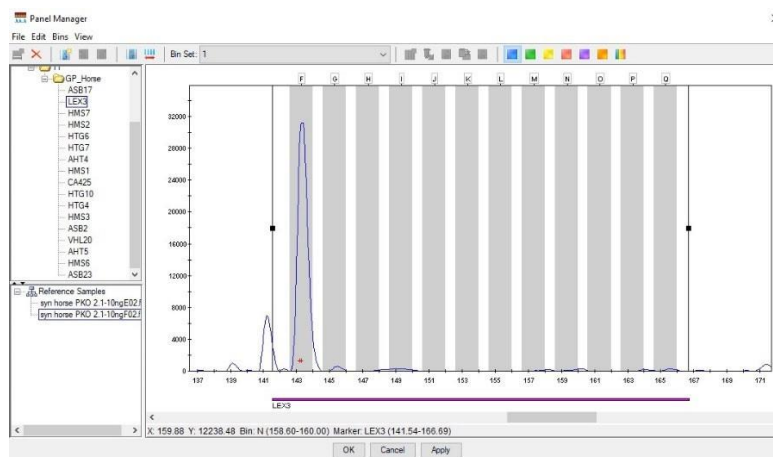
11. Справа появятся выбранные папка и файл. Внизу справа нажать кнопку «Add».



12. В предыдущем окне слева появятся выбранные референсные образцы. Выбрать из списка локус, который необходимо редактировать, внизу выбрать образец ПКО.



13. 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.



14. Проверить, что всем пикам ПКО были присвоены верные значения.
15. После настройки значений локуса нажать кнопку «**Apply**».
16. Повторить действия со всеми локусами, которым были неверно присвоены аллельные состояния.
17. Нажать кнопку «**OK**».

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

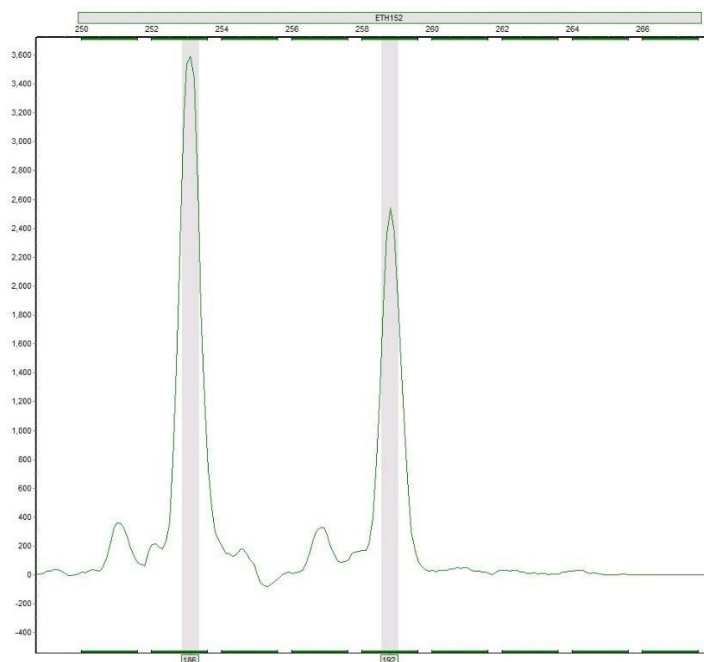
1. Открыть образец.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал.
3. Убедиться, что всем пикам анализируемого образца по данному каналу присвоено значение аллеля.
4. Повторить действие со всеми каналами.

7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

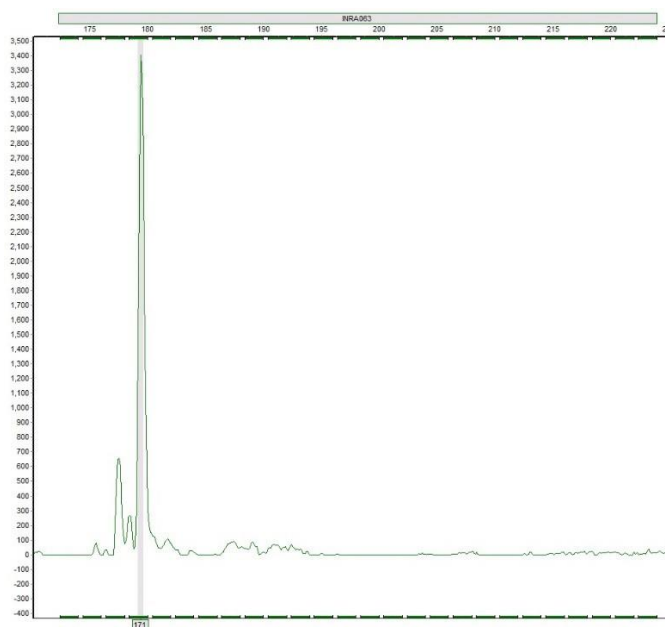
Аллельный статус исследуемого образца оценивается по каждому локусу отдельно.

При анализе каждого локуса необходимо учитывать следующие пункты:

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



Гетерозиготный генотип, 186/192 аллель в локусе ETH152

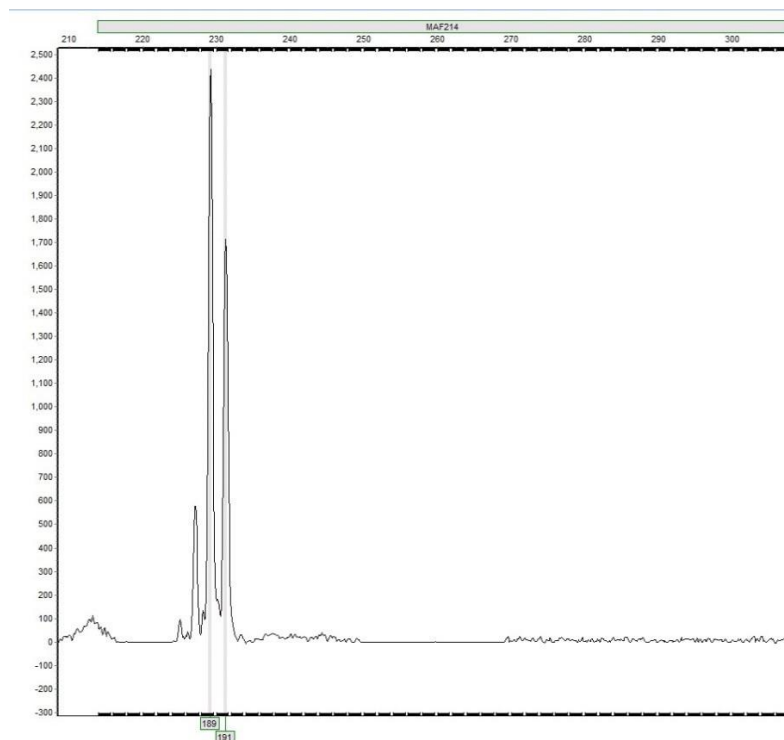


Гомозиготный генотип, 171 аллель в локусе INRA063

- Локусы, используемые в наборе GeneProfile Sheep, динуклеотидны (аллели локуса отличаются на 2 нуклеотида), вследствие этого для каждой аллели характерны высокие статтеры – продукты амплификации, которые

обусловлены «проскальзыванием» полимеразы при амплификации микросателлитных участков. Размер статтера будет отличаться от размера целевого аллеля на два нуклеотида. Уровень сигнала статтера обычно не превышает 50–70% аллеля.

- Если в локусе аллели отличаются на один повтор (2 нуклеотида), статтер более длинного аллеля накладывается на целевой пик короткого аллеля, тем самым увеличивая уровень его сигнала.



Гетерозиготный генотип в локусе MAF214 с наложением статтера аллели 191 на аллель 189.

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

Локус	Заявленный генотип	Генотип, полученный в ходе исследования
OarFCB20	75/87	75/87
AMEL	X	X
McM527	162	162
CSRD247	247/253	247/253
INRA006	130	130
INRA063	165/167	165/167
ETH152	188	188

INRA172	148/152	148/152
MAF065	121	121
MAF214	183	183
McM042	91	91
INRA005	135	135
INRA023	196/208	196/208

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

Локус	Заявленный генотип	Генотип, полученный в ходе исследования
OarFCB20	75/87	75/ 101
AMEL	X	X
McM527	162	162
CSRD247	247/253	247/253
INRA006	130	130
INRA063	165/167	165/167
ETH152	188	188
INRA172	148/152	148/152
MAF065	121	121
MAF214	183	183
McM042	91	91
INRA005	135	135
INRA023	196/208	196/208

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

Локус	Животное 1, аллельное состояние	Животное 2, аллельное состояние
OarFCB20	75/87	75/99
AMEL	X	X
McM527	162	162
CSRD247	247/253	247/259
INRA006	130	130
INRA063	165/167	167/193

ETH152	188	188
INRA172	148/152	142/ 152
MAF065	121	121
MAF214	183	183
McM042	91	91
INRA005	135	135
INRA023	196/208	202/ 208

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

Локус	Животное 1, аллельное состояние	Животное 2, аллельное состояние
OarFCB20	75/87	75/99
AMEL	X	X
McM527	162	162
CSRD247	247/253	247/259
INRA006	130	130
INRA063	165/167	191/193
ETH152	188	188
INRA172	148/152	142/ 152
MAF065	121	121
MAF214	183	183
McM042	91	91
INRA005	135	135
INRA023	196/208	202/ 208

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