

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению
«Набора реагентов для генетического
типирования осетров
«ГенЭксперт-Осетр»»**

Содержание

1.	Описание набора и область применения	3
1.1.	Описание набора	3
1.2.	Область применения	4
2.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	4
2.1.	Компоненты набора, состав и количество	4
2.2.	Количество анализируемых проб	5
2.3.	Условия хранения и транспортирования, срок годности	5
2.4.	Основные характеристики набора.....	5
2.5.	Количественный и качественный анализ ДНК	5
2.6.	Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование	6
3.	РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ	7
3.1.	Аллельная лестница	7
3.2.	Положительный контрольный образец.....	7
4.	ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	8
4.1.	Подготовка к проведению реакции амплификации.....	8
4.2.	Проведение амплификации.....	9
5.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05	10
5.1.	Проведение спектральной калибровки	10
5.2.	Подготовка и загрузка продуктов амплификации	10
5.3.	Запуск фрагментного анализа	11
6.	АНАЛИЗ ДАННЫХ	11
6.1.	Импорт файлов для анализа данных	11
6.2.	Создание проекта анализа данных	13
6.3.	Размерный стандарт СД-450	20
6.4.	Анализ аллельной лестницы	21
6.5.	Анализ положительного контрольного образца (ПКО)	22
6.6.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	23
6.7.	Анализ образца	23
7.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05	23
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	24
	ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	24

1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание набора

Набор реагентов «ГенЭксперт-Осетр» предназначен для генетической паспортизации и определения родства осетровых видов рыб.

Принцип действия набора основан на мультиплексной амплификации 7-ми STR-локусов с последующим анализом длин ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза с детекцией лазер-индуцируемой флуоресценции.

Для амплификации каждого STR-локуса используется пара праймеров, обеспечивающих эффективную и высокоспецифичную ПЦР-амплификацию. Один праймер из каждой пары содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель: одиночный 6FAM, 5R6G или двойной краситель с резонансным переносом энергии флуоресценции 6TAMRA-6FAM, 6ROX-6FAM, 6SY630-6FAM (см. таблицу 1). Фрагменты стандарта длин СД-450 мечены одиночным красителем SY660. Использование шести красителей позволяет одновременно детектировать семь групп продуктов амплификации и стандарт длин в одном капилляре.

Таблица 1.
Характеристика STR локусов набора «ГенЭксперт-Осетр»

Краситель	Локус	Структура повтора	Диапазон длин ампликонов, п.н.	Диапазон аллелей	Ссылка на публикацию	GenBank Access#
6FAM	AoxD161	ATCT	98-153	6-18	[1]	AY093639
	AfuG41	ATCT	182-274,5	6-28	[2]	AF529463
5R6G	LS19	GTT	124,5-164	5-17	[3]	AFU72730
6TAMRA-6FAM	AfuG135	ATCT	184-276	8-30	[2]	AF529514
6ROX-6FAM	AfuG37	ATCT	144-212	8-24	[2]	AF529461
	Spl173	ATCT	228-324	7-28	[4]	AF276216
6SY630-6FAM	AoxD165	ATCT	157-226	5-21	[1]	AY093640

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 7 STR-локусов в одной пробирке. Размер амплифицируемых ПЦР продуктов находится в диапазоне от 98 до 324 пар нуклеотидов (с учетом всех известных на сегодня аллелей). Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов Нанофор 05 (ООО «НПФ Синтол», Россия).

Для получения полного (по всем 7-ми STR-локусам) генотипа исследуемого образца достаточно 1-10 нанограмм (нг) недеградированной ДНК. Оптимальное количество ДНК в реакцию — 5 нг.

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

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 6 месяцев без ухудшения аналитических характеристик набора. Реакция активируется добавлением 20 мкл специального раствора (раствор активатора) в каждую пробирку. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Набор реагентов «ГенЭксперт-Осетр» может использоваться для создания баз данных с ДНК паспортами осетровых видов рыб.

Сводная информация о STR-локусах набора «ГенЭксперт-Осетр» представлена в таблице 1. Структура единицы повтора приводится в соответствии с данными секвенирования.

1.2. Область применения

Набор может быть использован в научно-исследовательских лабораториях институтов, испытательных лабораториях надзорных ведомств для генотипирования осетровых видов рыб и установления родства, а также для изучения генетического разнообразия.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор «ГенЭксперт-Осетр» поставляется в пробирках, объединенных по 8 штук в стрипы с отдельно прикрепленными крышками и рассчитан на 48 реакций:

Название	Реакций в наборе	Каталожный номер
«ГенЭксперт-Осетр»	48	ГЭ-О-48

2.1. Компоненты набора, состав и количество

1.	Микропробирки с лиофилизированными реакционными смесями, 8 х 0,2 мл	6 стрипов
2.	Раствор для разведения РБ, синяя крышка, 1 шт.	5 мл
3.	Деионизованная вода, 2 шт.	2 мл
4.	Положительный контрольный образец, лиофилизированный, оранжевая крышка, 1 шт.	20 реакций
5.	Аллельная лестница, лиофилизированная, красная крышка, 1 шт.	20 нанесений
6.	Стандарт длины СД-450, жидкий, голубая крышка, 1 шт.	120 нанесений
7.	Спектральный калибратор СК-6, жидкий, фиолетовая крышка, 1 шт.	120 нанесений

Микропробирки с лиофилизированными реакционными смесями предназначены для проведения в них полимеразной цепной реакции. На дне пробирок содержатся все необходимые компоненты ПЦР включая термостабильную Taq-ДНК-полимеразу, смесь дНТФ, реакционный буфер, праймерную смесь в сухом виде. Благодаря наличию флуоресцентно-меченных праймеров сухая реакционная смесь на дне пробирок имеет розовый цвет.

Раствор для разведения используется для разведения лиофилизированной реакционной смеси. Содержит буферный раствор и ионы магния Mg^{2+} в качестве активатора ПЦР.

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

Стандарт длины СД-450 представляет собой жидкую смесь флуоресцентно-меченных красителем **SY660** (спектральным аналогом красителя LIZ) одноцепочечных фрагментов ДНК разной длины. Стандарт длины *СД-450* содержит следующие 22 фрагмента ДНК (н.п.): 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450. Стандарт длины *СД-450* используется на этапе капиллярного электрофореза, вносится в каждый исследуемый образец по 1 мкл и позволяет определять длины амплифицированных фрагментов исследуемого образца и длины фрагментов аллельной лестницы. Благодаря высокой плотности фрагментов стандарта *СД-450* обеспечивается высокая точность и воспроизводимость определения длины амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Одна пробирка стандарта длины *СД-450* рассчитана на анализ 120 образцов.

Аллельная лестница представляет собой лиофилизированную смесь из **58** флуоресцентно-меченных амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующих аллельным вариантам исследуемых локусов. 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. 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.

2.2. Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение 48 реакций, включая контрольные образцы.

2.3. Условия хранения и транспортирования, срок годности

При транспортировке компонентов требуется соблюдение специального температурного режима (+2 – +8 °С). Сухие реакционные смеси и аллельная лестница чувствительны к воздействию света и должны храниться в темном месте.

Сразу после получения набора рекомендуется хранить его в темноте при температуре +2 – +8 °С.

Для более длительного хранения аллельной лестницы и положительного контрольного образца рекомендуется их хранение при –20 °С.

2.4. Основные характеристики набора

Количество одновременно анализируемых маркеров — 7.

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 6.

Оптимальное количество вносимой ДНК – 1-10 нг.

2.5. Количественный и качественный анализ ДНК

Для выделения ДНК рекомендуется использовать Набор реагентов «ДНК-Экстран-2» для выделения ДНК из тканей животных и человека (ООО «НПФ Синтол», каталожный номер EX-511).

Количественная и качественная оценка экстрагированной ДНК необходима для последующего ПЦР-анализа. Такая оценка может выполняться либо физическими (например, измерением поглощения при специфической длине волны), физико-химическими (например, применением интеркалирующих или связующих агентов, обладающих флюоресцентными свойствами), ферментативными (например, биoluminesцентным обнаружением) методами, либо путем количественной ПЦР в реальном времени.

Определить концентрацию ДНК, а также степень ее чистоты, можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее.

Для оценки чистоты препарата ДНК проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 230 нм, т.е. на максимумах поглощения для ДНК, белков и полисахаридов, соответственно. Значение соотношения A260/280 для чистой ДНК должно быть больше 1,8, значение A260/230 должно быть больше 2,2.

2.6. 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. Стрипы с крышками 0,2 мл.
3. Штатив для 96-ти луночных ПЦР планшет 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-ти луночные ПЦР планшеты или микропробирки в стрипах для ПЦР.
7. Пленка для 96-ти луночных ПЦР планшет или крышки к микропробиркам в стрипах.
8. Центрифуга-вортекс для пробирок объемом 1,5 или 2 мл (Циклотемп-901).
9. Центрифуга для 96-ти луночных ПЦР планшет.
10. Прибор для проведения ПЦР с возможностью изменения параметра increment/decrement (повышение/понижение температур).
11. Полимер для проведения капиллярного электрофореза (ПДМА-4/ПДМА-6).
12. Буфер для проведения капиллярного электрофореза (ТАПС).
13. Деионизованный формамид.
14. Автоматический генетический анализатор (Нанофор 05).

3. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ

3.1. 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 при температуре +2 – +8 °С. Для длительного хранения (более 3 месяцев) рекомендуется хранить раствор в замороженном виде. Следует избегать многократной разморозки.

3.2. Положительный контрольный образец

Сразу после получения набора, пробирку с ПКО 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 сухим ПКО (оранжевая крышка) 20 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки центрифугированием в течение нескольких секунд. После разведения ПКО необходимо хранить при температуре +2 – +8 °С. Для длительного хранения (более 3 месяцев) рекомендуется хранить раствор в замороженном виде. Следует избегать многократной разморозки. С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контроль (1 мкл разведенного ПКО) и один отрицательный контроль (1 мкл деионизированной воды).

4. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1. Подготовка к проведению реакции амплификации

Достать пробирки ПКО, раствор активатора и исследуемые образцы, а также стрипы с лиофилизированной реакционной смесью. Выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на вортексе жидкие растворы и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель.

В каждую микропробирку с сухой реакционной смесью внести:

Компоненты набора	Объем на 1 образец, мкл
Сухая реакционная смесь	
Раствор для разведения РБ	20
Геномная ДНК (1-10 нг) или ПКО	2
Деионизированная вода, до конечного объема 25 мкл	3

Полученную смесь перемешать на вортексе и центрифугировать в течение нескольких секунд.

Вносить исследуемые образцы или ПКО необходимо с помощью наконечников с аэрозольным барьером. После внесения всех компонентов, реакционную смесь необходимо тщательно перемешать, используя вортекс.

Примечание: используются образцы ДНК с концентрацией 1-10 нг/мкл. При разведении геномной ДНК водой важно помнить, что в деионизированной воде происходит постоянный гидролиз ДНК. Для длительного хранения рекомендуется разведение ДНК в буферах (рН > 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.

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

4.2. Проведение амплификации

Поместить подготовленные в соответствии с п.4.1 смеси в стрипах в прибор для ПЦР. Убедиться, что крышки пробирок плотно закрыты и запустить программу амплификации:

Температура	Время	Количество циклов	Increment/decrement
95 °C	2 мин	1	
92 °C	10 сек	19	
64 °C	30 сек		-0.2 °C per cycle
72 °C	20 сек		
92 °C	10 сек	9	
60 °C	30 сек		+0.2 °C per cycle
72 °C	20 сек		
92 °C	10 сек	34	
62 °C	30 сек		
72 °C	20 сек		
72 °C	5 мин	1	
4 °C	10 мин	1	

После завершения программы ПЦР амплифицированные продукты можно хранить неделю при +2 - +8 °C в защищенном от света месте. В случае, если амплифицированные продукты необходимо хранить более недели, рекомендуется заморозить их при -20 °C.

5. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05

Для получения полного STR-профиля проводится фрагментный анализ – электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «ГенЭксперт-Осетр».

Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 6-ти цветным калибратором **СК-6** (ООО «Синтол», кат. № СК-0601).

5.1. Проведение спектральной калибровки

1. В отдельной пробирке смешать 80 мкл **Ди-формамида** (ООО «Синтол», кат.№ ДИ-ФА) и 4 мкл **раствора СК-6**, перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
2. Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки одного ряда 96-луночного планшета (возможно нанесение в любой ряд планшета) или в стрипованные микропробирки. При необходимости удалить пузыри со дна лунок (пробирок) кратким центрифугированием.
3. Установить 96-луночный планшет или стрипованные микропробирки в прибор для капиллярного электрофореза.
4. Провести калибровку по стандартному протоколу **СК-6**.

5.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

1. Развести ПЦР продукты в 20-40 раз деионизированной водой (ddH₂O). В зависимости от эффективности прохождения реакции в образцах из разного исходного материала сигналы во время электрофореза могут отличаться. Следует подобрать оптимальное разведение ПЦР продуктов ddH₂O.
2. Приготовить смесь **Ди-формамида** и размерного стандарта **СД-450** в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну микропробирку, 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 аллельную лестницу.

3. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
4. Добавить по **10 мкл** смеси в каждую микропробирку плашки/стрипа.
5. Внести в смесь по 1 мкл **разведенного в 20-40 раз ПЦР-продукта**.
6. В отдельную лунку внести **1 мкл раствора аллельной лестницы**.
7. Закрыть микропробирки плашки/стрипа.
8. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
9. Денатурировать образцы 5 мин при 95 °С.

ПРИМЕЧАНИЕ! 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 Ди-формамида.

10. Собрать плашку и загрузить в генетический анализатор в соответствии с Руководством пользователя прибора Нанофор 05.

5.3. 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-4	ПДМА-6
Параметры		
Температура первого термостата, [°C]	60	60
Температура второго термостата, [°C]	60	60
Длительность шага высокого при фореze, [сек]	15	15
Напряжение шага высокого при фореze, [В]	1000	1000
Напряжение ввода пробы, [В]	1800	1800
Время ввода пробы, [сек]	3	3
Напряжение электрофореза, [В]	12200	12200
Время электрофореза, [сек]	1550	2300
Время исключения регистрации электрофореза, [сек]	580	750

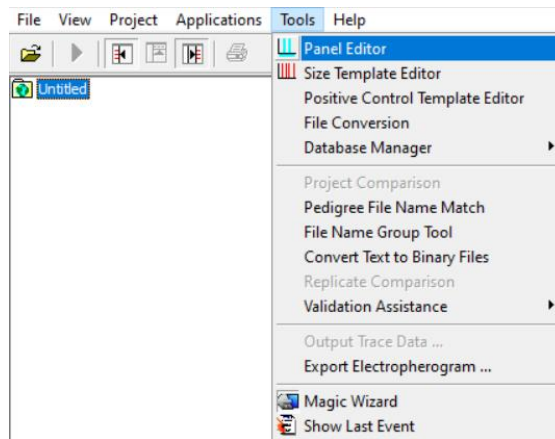
6. АНАЛИЗ ДАННЫХ

После завершения программы измерений, данные следует проанализировать. Анализ данных проводится с помощью программы «GeneMarker».

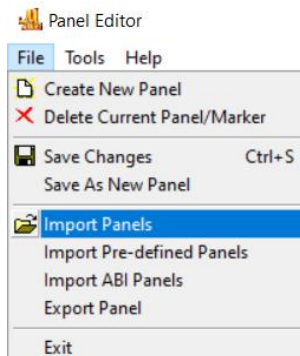
6.1. Импорт файлов для анализа данных

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

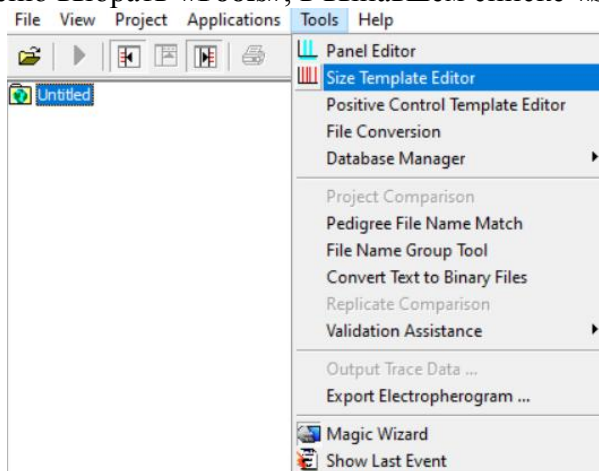
1. Запустить программу «GeneMarker». В верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor»



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



3. Выбрать папку с файлом панели (GenExpert-Sturgeon) и подгрузить его в программу «GeneMarker»
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»



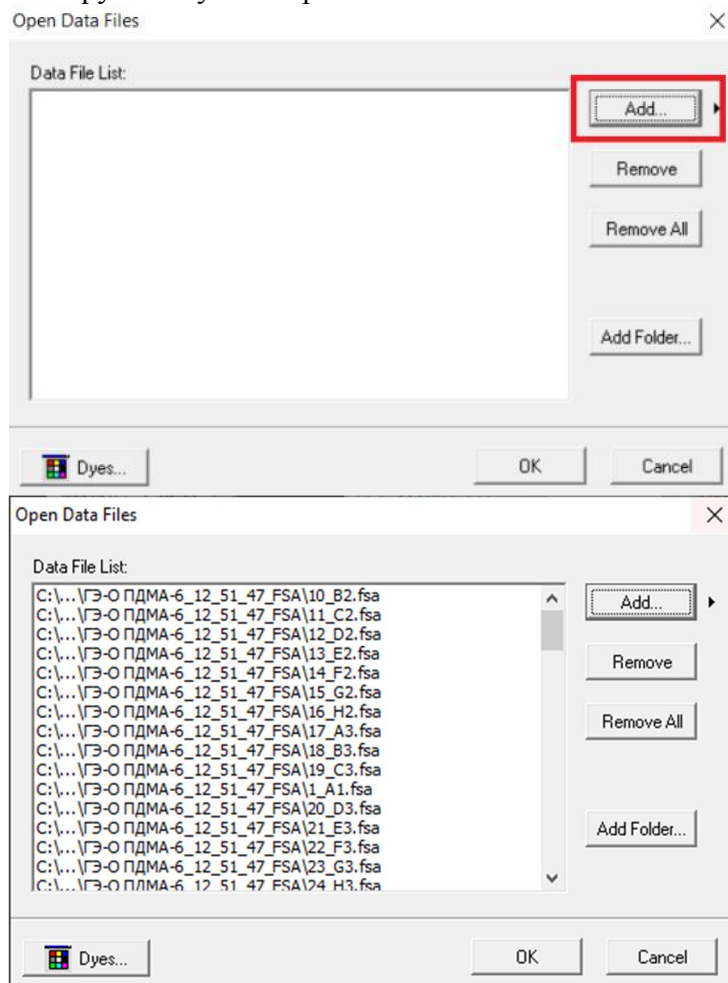
7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (**SD450**) и подгрузить его в программу «GeneMarker»
8. Закрыть окно «Size Template Editor»

6.2. Создание проекта анализа данных

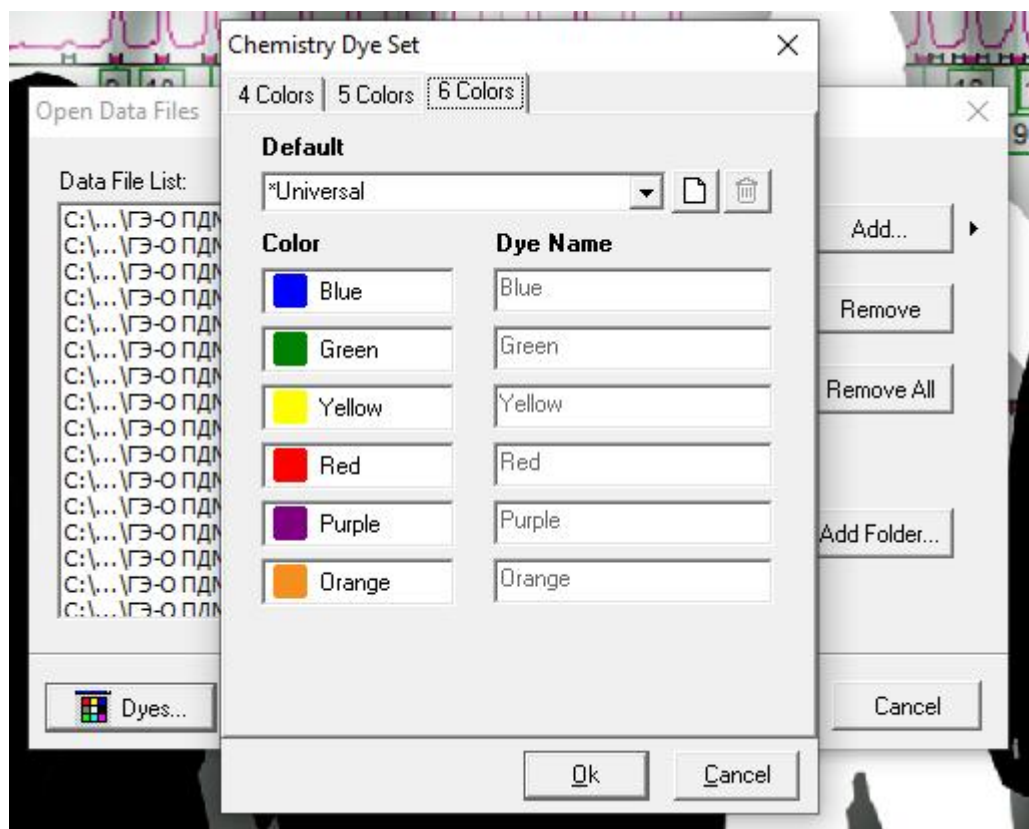
1. Запустить программу «GeneMarker». Кликнуть по «Open Data» в окне «Start your project»



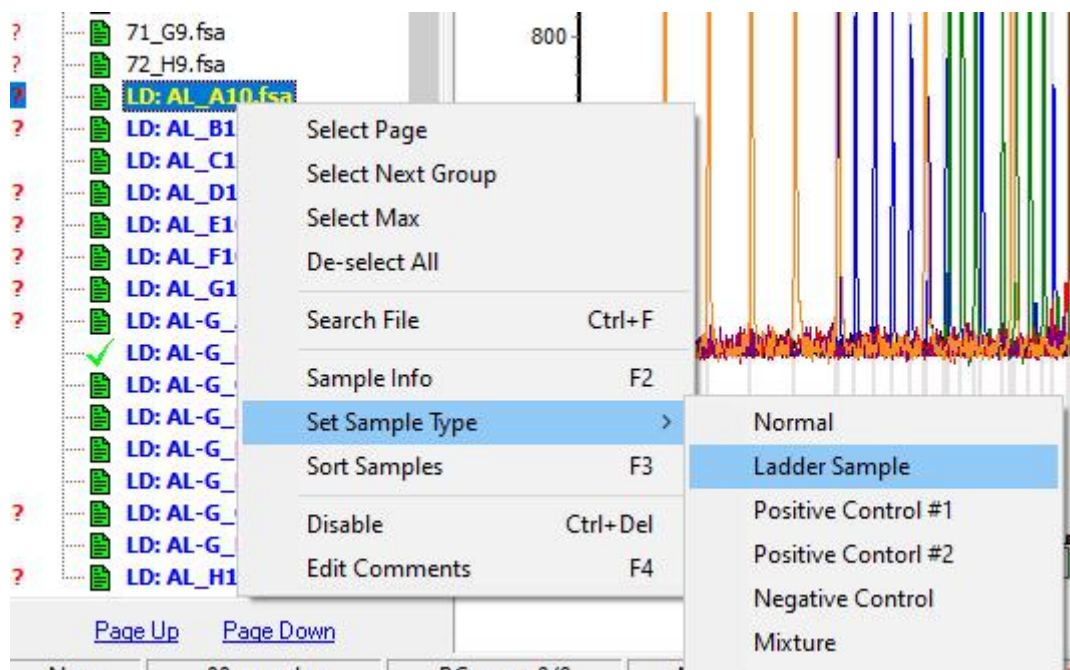
2. Нажать «Add» и загрузить нужные файлы



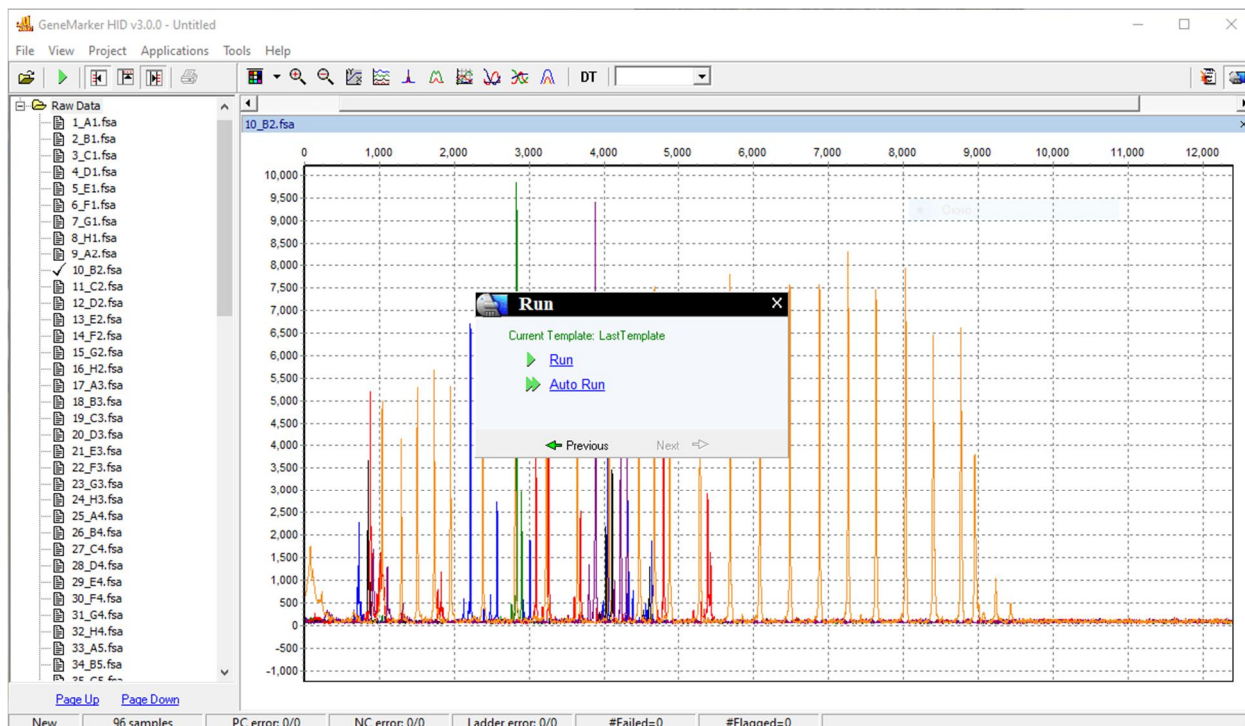
3. Нажать в левом нижнем углу «Dyes» и выбрать 6 каналов и «OK».



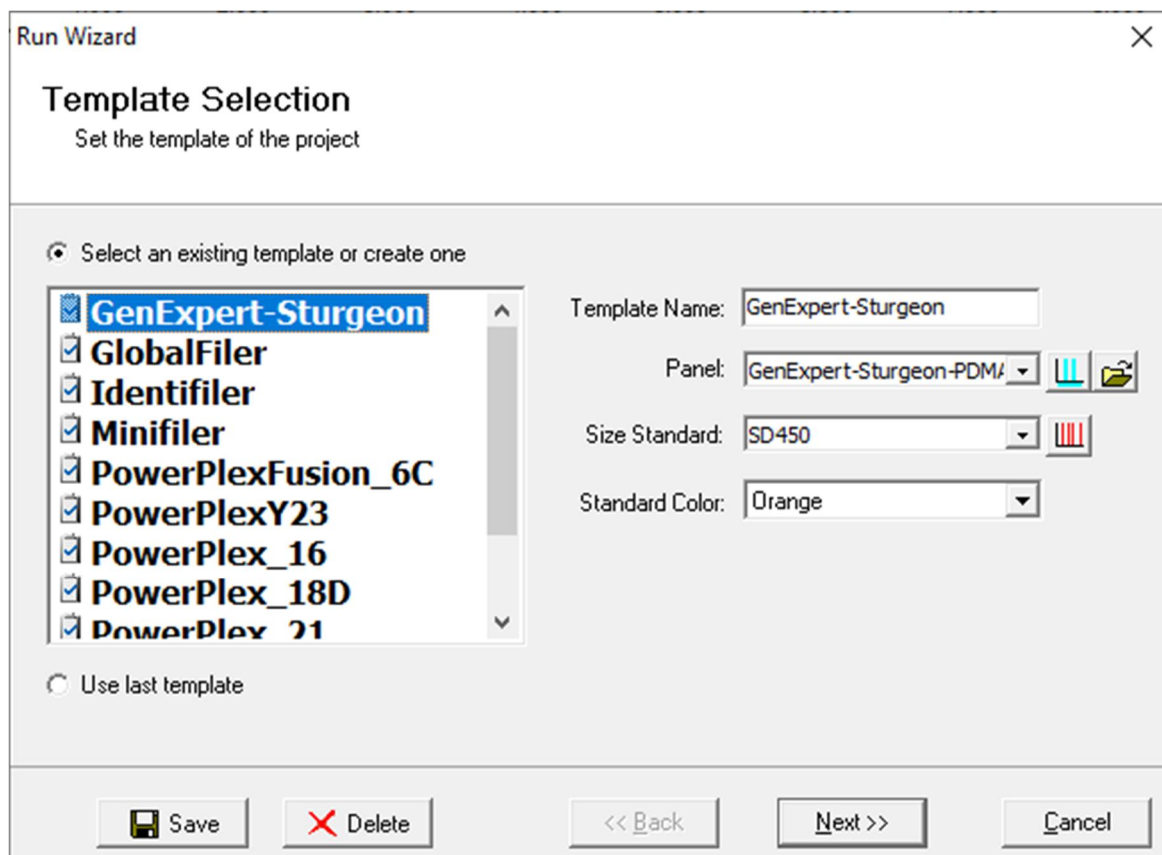
4. После добавления файлов нажать «ОК».
5. Назначить **Allelic Ladder**, выбрав нужный образец из прогона и правой кнопкой мыши нажать «Set Sample Type» и затем «Ladder Sample».



6. Запустить анализ нажав на клавишу «Run».



7. В открывшемся окне «Run Wizard» выбрать «Select an existing template or create one» и в «Template Name» внести имя метода «GenExpert-Sturgeon», в графе «Panel» выбрать панель «GenExpert-Sturgeon», в графе «Size Standard» выбрать размерный стандарт «SD450», нажать «Save» и затем «Next».



8. В следующем окне «Run Wizard» выставить настройки и нажать «Save» и затем «Next»:

Run Wizard

Data Process - HID Analysis

Set data process options

Raw Data Analysis

Auto Range (frame)

Start: End:

Smooth Enhanced Smooth

Baseline Subtraction:

Superior Classic Enhanced

Pull-up Correction Spike Removal

Saturation Detection Saturation Repair

Allele Call

Auto Range (bps)

Start: End:

Max Intensity:

Peak Detection Threshold: Dye Specific

Min Intensity:

Percentage > Global Max

Note: Use Panel Editor to set Min Intensity and % Global Max for peaks within Markers

Size Call

Local Southern Cubic Spline

Save
Delete
<< Back
Next >>
Cancel

Run Wizard

Additional Settings - HID Analysis

Set additional options related to the different analysis type

Allelic Ladder:

P.C. Template 1:

P.C. Template 2:

Allele Evaluation

Peak Score:

Reject < Check < Pass

Mixture Evaluation

Valid Mixture Peak Percentage: %

Min Mixture Marker Number:

Auto Select Best Ladder

Allow Match # Variance:

Max Average Size Diff:

Use Ladder Library

Min Heterozygosity:

Auto Panel Adjustment

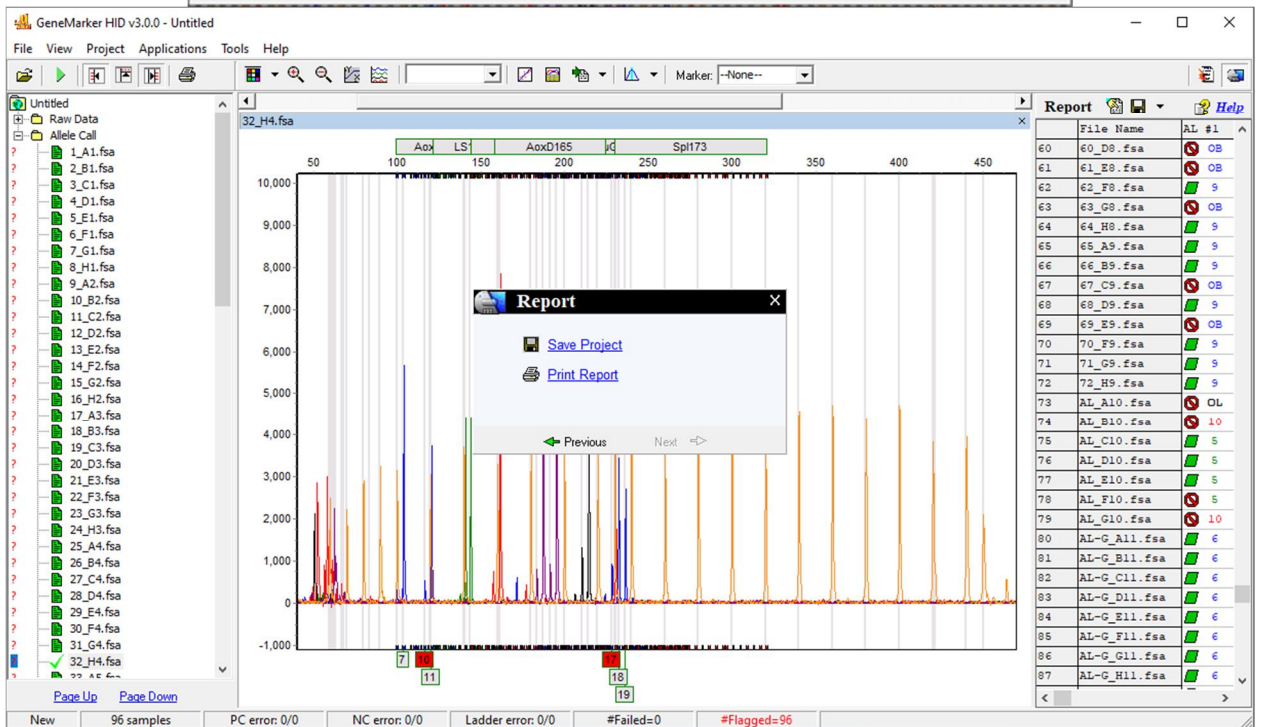
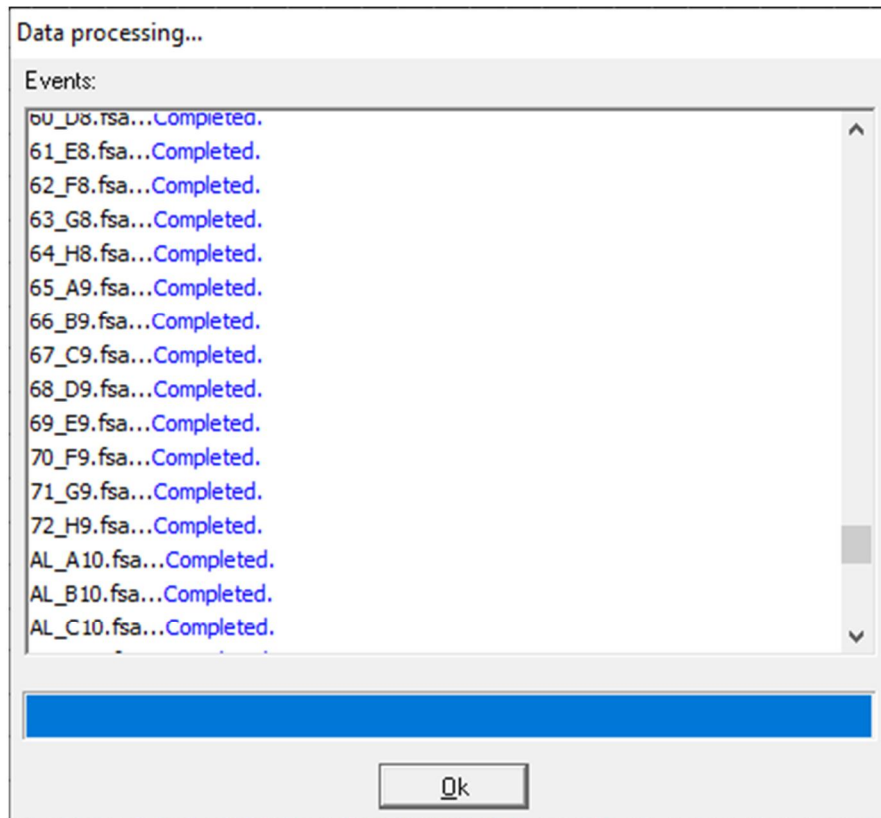
Sample Quality Sensor

'Q' Allele: _____

'S' Allele: _____

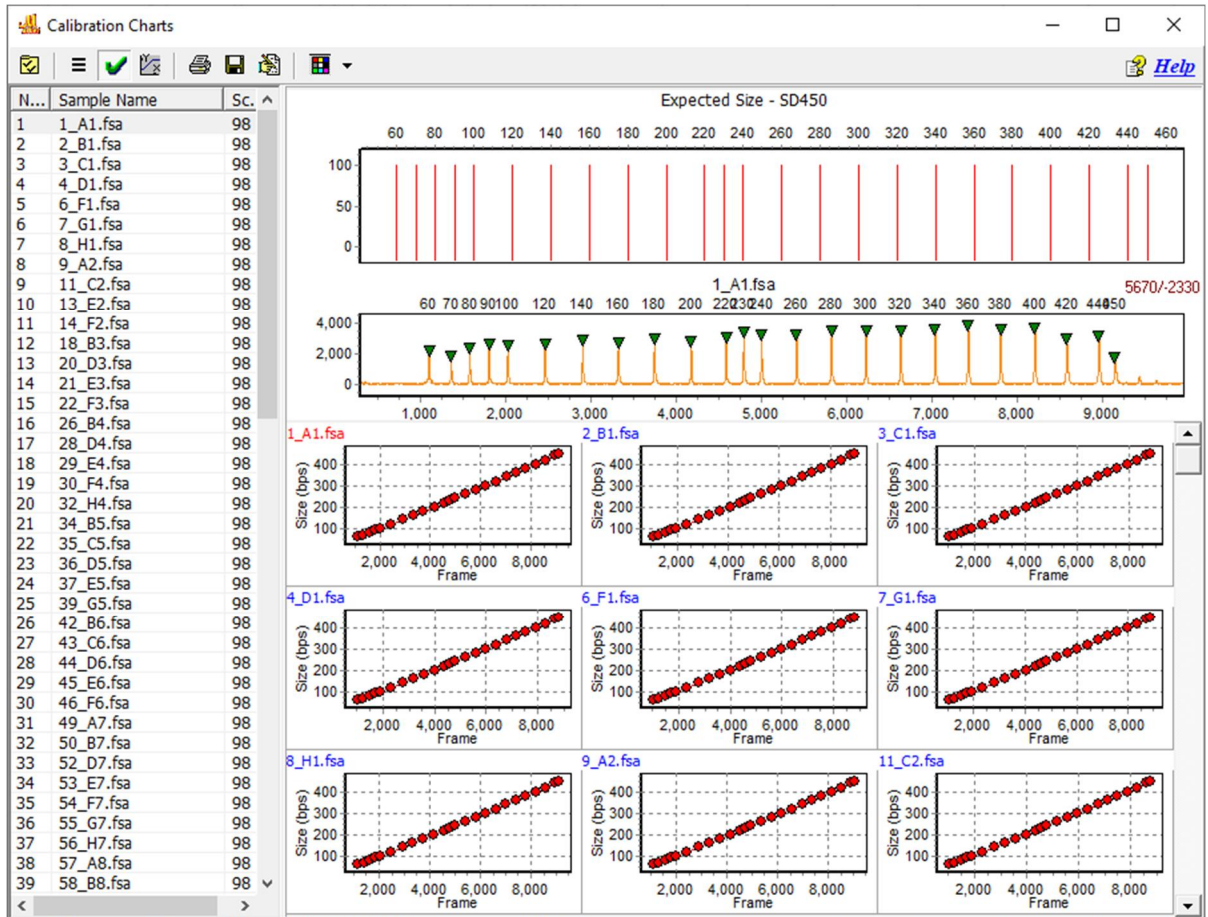
Save
Delete
<< Back
Ok
Cancel

9. Параметры в следующем окне оставить без изменения и нажать «Save» и затем «OK».
10. Идет анализ.

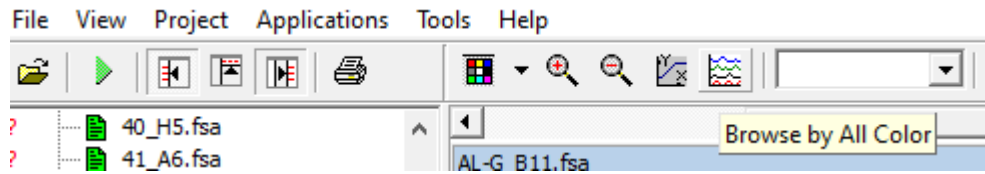


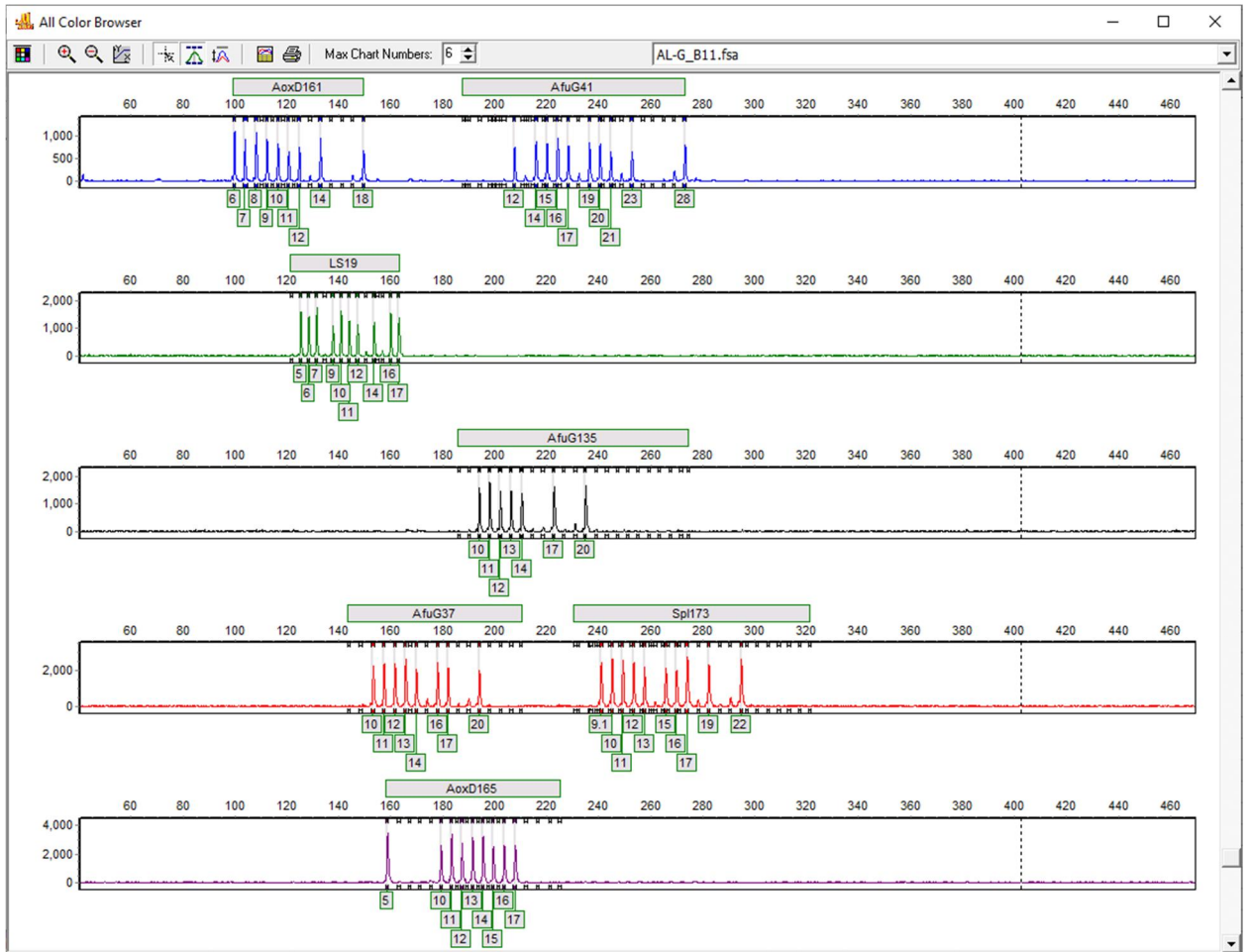
11. Проверить качество проанализированного размерного стандарта в окне «Size Calibration», оно должно быть выше 97%.





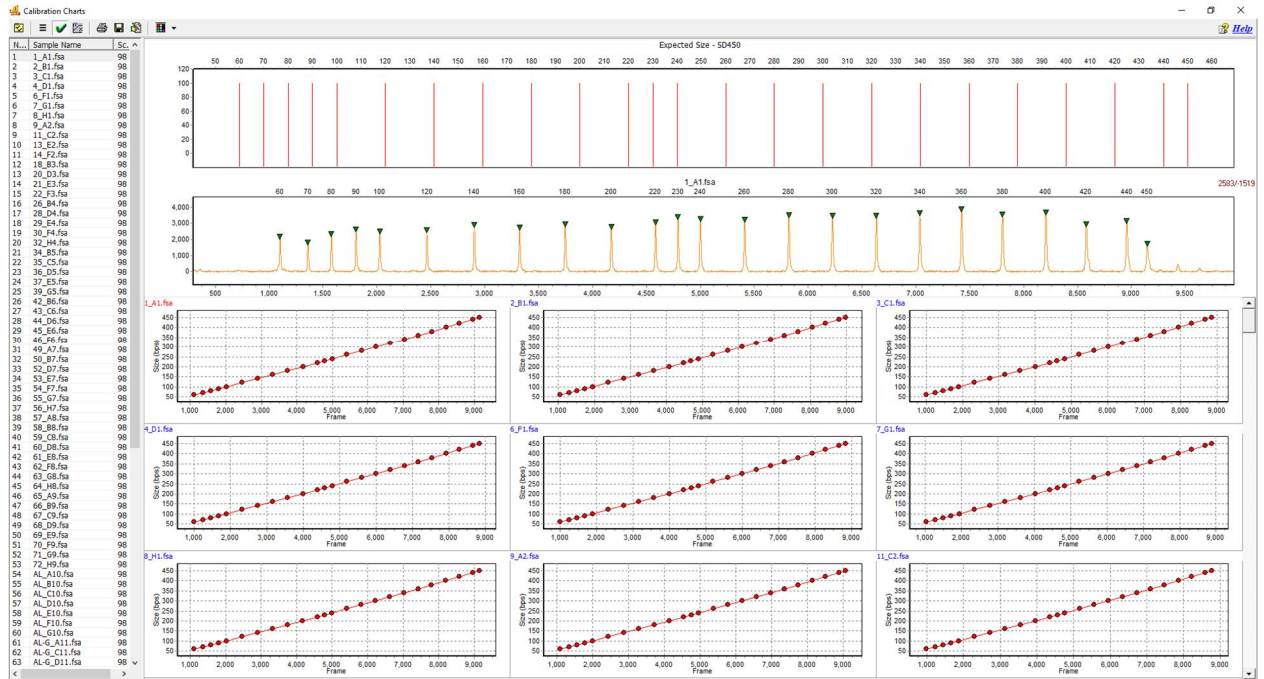
12. В окне «Browse by All Color» проверить расстановку Аллельной лестницы.





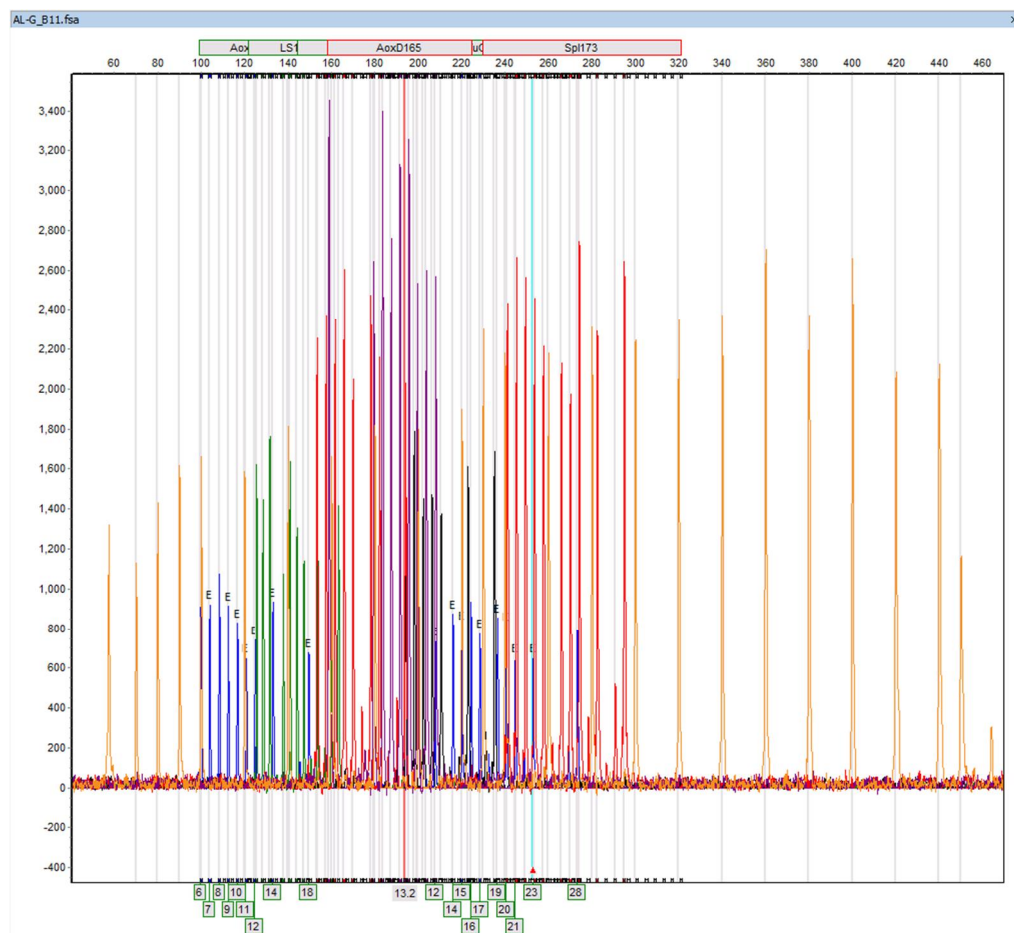
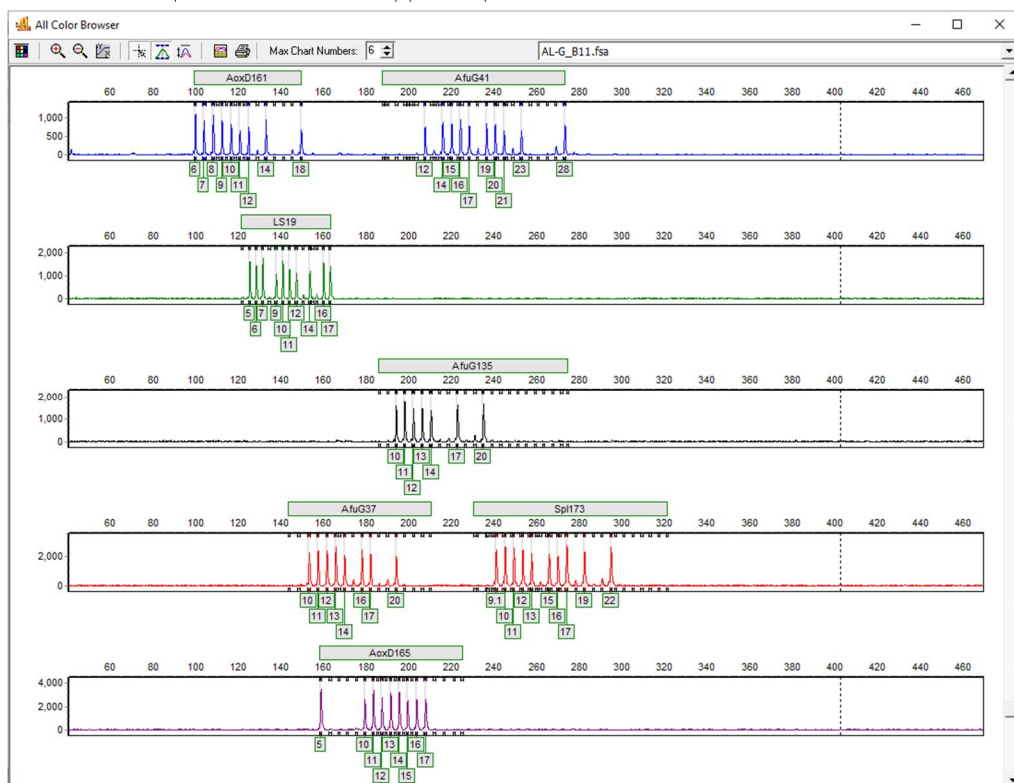
6.3. Размерный стандарт СД-450

Ниже приводится пример электрофоретического разделения 24 фрагментов стандарта длины СД-450 в канале детекции SY660 (5-ый из 6-ти каналов детекции). 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.



6.4. Анализ аллельной лестницы

Ниже приводится расстановка электрофоретически разделенных 63 фрагментов Аллельной лестницы по 5 каналам детекции.



6.5. Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

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

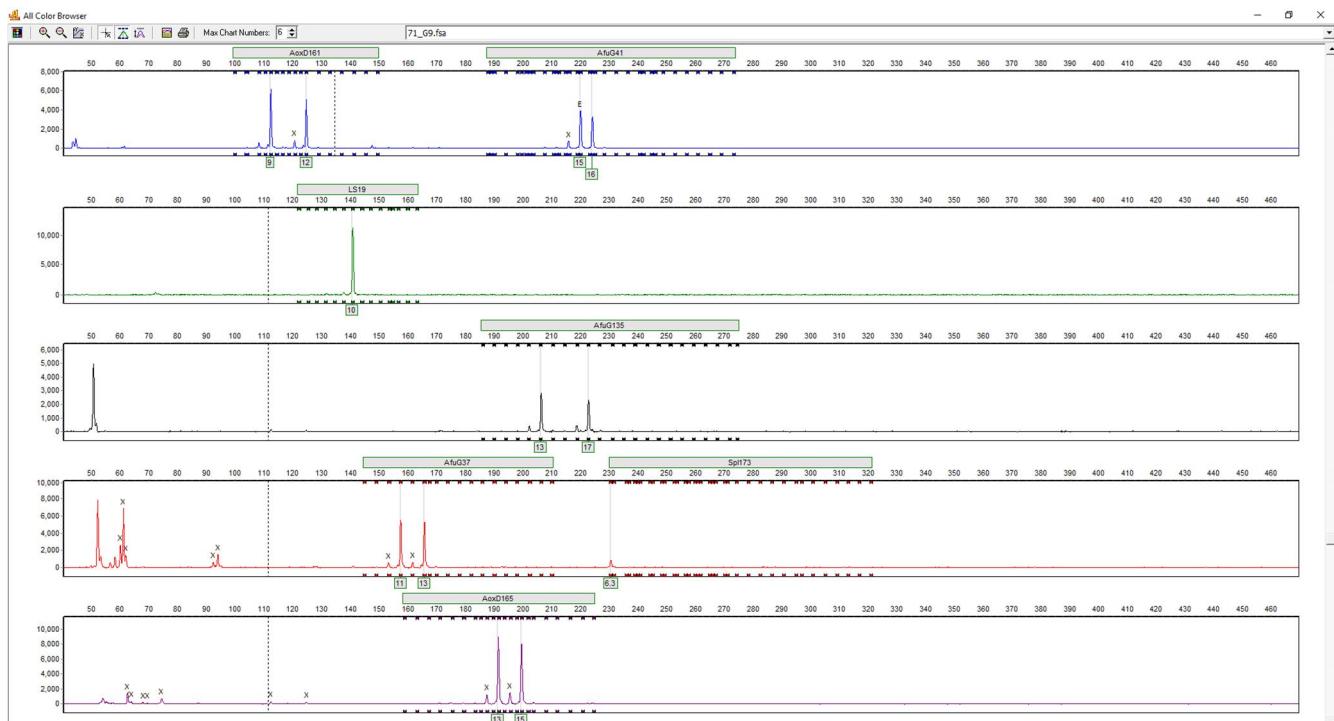


Таблица 3. Аллельное состояние положительного контрольного образца (ПКО)

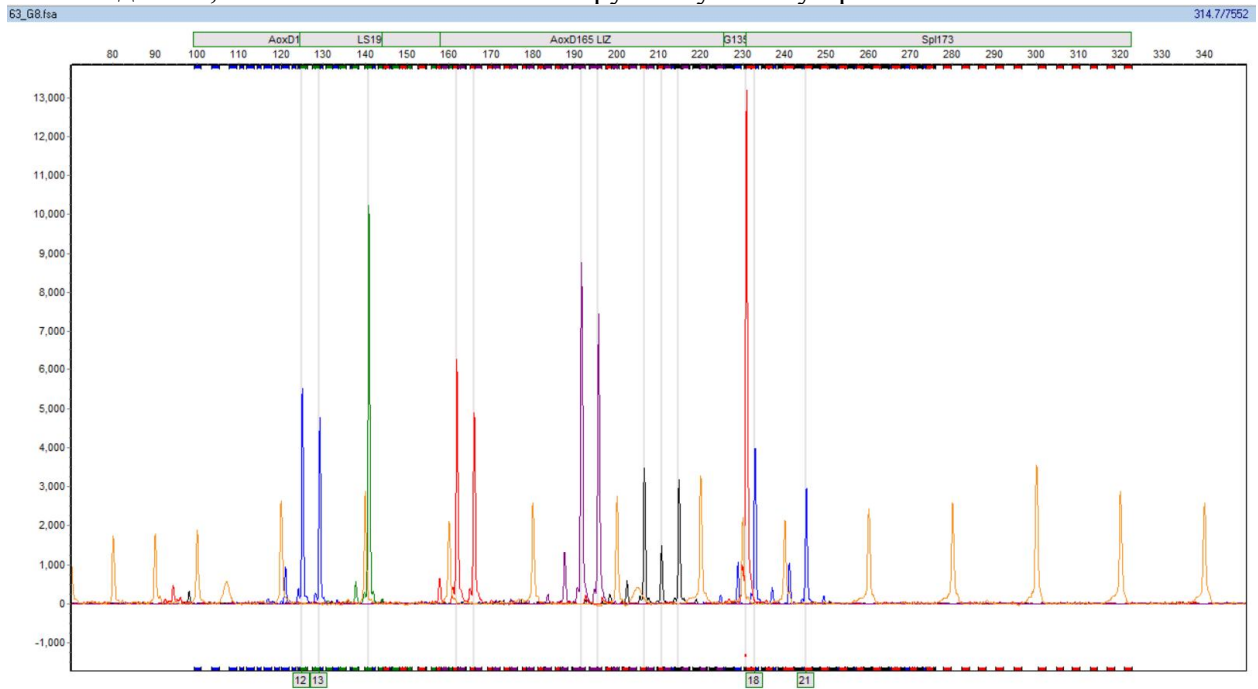
Канал детекции	Локус	Аллельное состояние
6FAM	AoxD161	9/12
	AfuG41	15/16
5R6G	LS19	10/10
6TAMRA-6FAM	AfuG135	13/17
6ROX-6FAM	AfuG37	11/13
	Spl173	6.3/6.3
6SY630-6FAM	AoxD165	13/15

6.6. 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.

6.7. Анализ образца

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



7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

При неаккуратном заборе исходного материала возможно получение генетических профилей со смешанным генотипом. При анализе древней ДНК или ДНК, хранившейся в ненадлежащих условиях возможно получение профиля, соответствующего частично деградированной ДНК (пики локусов с меньшими длинами выше, чем пики локусов с большими длинами). В случае получения генетических профилей, вызывающих эти и подобные вопросы, просьба обращаться к производителю набора и высылать сырые и обработанные данные электрофоретического разделения с фотографией или описанием объекта, из которого проводилось выделение ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Henderson-Arzapalo A, King TL (2002) Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and bloodstock management. *Mol Ecol Notes* 2:437–439
2. Welsh AB, Blumberg M, May B (2003) Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris*. *Mol Ecol Notes* 3:47–55
3. May B, Krueger CC, Kincaid HL (1997). Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 1542–1547.
4. McQuown EC, Sloss BL, Sheehan RJ, Rodzen J, Tranah GJ, May B (2002) Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 129, 1380-1388

ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

ООО “Синтол”: www.syntol.ru

Техническая поддержка

Информацию о наших продуктах и услугах Вы можете найти на сайте ООО “Синтол”:
www.syntol.ru

Контакты: 127550, Москва, Тимирязевская 42,

Компания СИНТОЛ

Тел.:

+7 (495) 984-69-93 многоканальный

+7 (499) 977-74-55

+7 (495) 506-79-97

Факс:

+7 (495) 984-69-93

+7 (499) 977-74-55

E-mail:

syntol@syntol.ru

info@syntol.ru

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