

## **Синдром Жильбера, UGT1A1**

**Набор реагентов для определения количества ТА-повторов в промоторной области гена UGT1A1 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 .....	6
3.1.	Подготовка к проведению реакции амплификации.....	6
3.2.	Подготовка к проведению реакции амплификации из цельной крови .....	6
3.3.	Проведение амплификации .....	7
4.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (НАНОФОР 05) .....	8
4.1.	Проведение спектральной калибровки .....	8
4.2.	Подготовка и загрузка продуктов амплификации .....	8
4.3.	Запуск фрагментного анализа .....	8
5.	ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (AB3500/AB3500XL).....	10
5.1.	Проведение спектральной калибровки .....	10
5.1.1.	Создание DyeSets .....	10
5.1.2.	Подготовка раствора спектрального калибратора .....	12
5.1.3.	Запуск спектральной калибровки .....	13
5.2.	Создание “Size Standarts” .....	14
5.3.	Создание “Sizecalling protocols”.....	15
5.4.	Создание “Instrument Protocol” .....	16
5.5.	Создание “Assay” .....	17
5.6.	Подготовка и загрузка продуктов амплификации .....	19
6.	АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	19
6.4.	Анализ данных в программах GeneMarker и GeneMarker HID .....	19
6.1.1.	Импорт файлов для анализа данных.....	19
6.1.2.	Создание проекта анализа данных .....	21
6.1.3.	Анализ размерного стандарта .....	23
6.1.4.	Анализ положительного контрольного образца (ПКО) .....	24
6.1.5.	Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО) .....	27
6.1.6.	Анализ образцов.....	27
6.1.7.	Исключение из анализа статтеров и артефактных пиков .....	27
6.2.	Анализ данных в Gene Mapper .....	28

6.2.1. Импорт файлов для анализа данных.....	28
6.2.2. Анализ данных.....	31
6.2.3. Анализ размерного стандарта .....	32
6.2.4. Анализ положительного контрольного образца (ПКО) .....	33
6.2.5. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО) .....	35
6.2.6. Анализ образца.....	35
7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	36

## 1. ОПИСАНИЕ НАБОРА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

### 1.1. Описание набора

Набор реагентов «Синдром Жильбера (Gilbert Syndrome)» предназначен для молекулярно-генетической диагностики синдрома Жильбера, основанный на определении количества ТА-повторов в промоторной области гена UGT1A1 методом капиллярного электрофореза. В основе работы набора лежит амплификация промоторной области гена UGT1A1, характеризующаяся увеличением количеством ТА-повторов с последующим анализом длин ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза.

Исследуемый маркер представляет собой область динуклеотидных ТА повторов геномной ДНК, в норме встречающиеся в геноме человека в варианте (ТА)6. Однако, в результате мутации, возможно, изменению числа нуклеотидных повторов. Количество повторов и размер амплифицируемых фрагментов известны и могут быть определены методом капиллярного электрофореза (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристика маркера UGT1A

Краситель	Локус	Аллельный вариант	Длина фрагментов, п.о. <sup>1</sup>
FAM	UGT1A1	(ТА)5	171
		(ТА)6	173
		(ТА)7	175
		(ТА)8	177

<sup>1</sup>Размеры аллелей могут варьироваться при использовании разных полимеров или конфигураций приборов

Размер амплифицируемых ПЦР продуктов находится в диапазоне от 171 до 177 пар нуклеотидов. 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 0,5 нанограмм (нг) не деградированной ДНК. Оптимальное количество ДНК в реакцию — 5 нг. Диапазон концентраций ДНК для проведения амплификации от 0,5 до 20 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 0,4 мкл цельной крови в приготовленную реакционную смесь.
- 2) С внесением 2 мкл раствора кровь/Н<sub>2</sub>О (2 мкл крови + 100 мкл Н<sub>2</sub>О) в приготовленную реакционную смесь.

### 1.2. Область применения

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

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

### 2.1. Состав набора

№	Наименование	Состав	Объем, мкл	Количество, шт
1	РС	2,5х Реакционная смесь	1000	1
2	СП	Смесь специфических праймеров	500	1
3	ПКО	Положительный контрольный образец – стабилизированный раствор ДНК человека	15	1
4	СД-240	Стандарт длин – набор фрагментов известной длины (60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240)	100	1
5	Н <sub>2</sub> О	Деионизованная Н <sub>2</sub> О	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. 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-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.
11. Полимер для проведения капиллярного электрофореза (ПДМА-4).
12. Буфер для проведения капиллярного электрофореза (ТАПС).
13. Деионизованный формамид.
14. Автоматический генетический анализатор (Нанофор 05).

### 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
<b>РС</b>	10	<b>10×N</b>
<b>СП</b>	5	<b>5×N</b>
<b>ДНК</b>	1-5	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	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 **СП** (согласно таблице), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
3. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по **15 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 H<sub>2</sub>O.
5. В одну из пробирок (планшеты, стрипы) с приготовленной рабочей реакционной смесью внести **10 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O (отрицательный контрольный образец), а в другую пробирку (планшет, стрип) внести **1 мкл ПКО** (положительный контрольный образец) и **9 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O.
6. Закрывать ПЦР пробирки.
7. 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 «Gilbert Syndrome» позволяет провести реакцию амплификации из цельной крови напрямую минуя стадию выделения ДНК.

##### Первый способ:

1. Внести в пробирку для ПЦР **10 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O.
2. Добавить **0,4 мкл** цельной крови.
3. Перемешать содержимое на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
4. Разморозить пробирки с **РС** и **СП**, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.

5. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем **РС** и **СП** (согласно таблице 2), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
6. Внести в пробирки для ПЦР со смесью **0,4 мкл** крови с **10 мкл** H<sub>2</sub>O по **15 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси.
7. В одну из пробирок ПЦР (планшеты, стрипы) внести **15 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси и внести **10 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O (отрицательный контрольный образец), в другую пробирку (планшет, стрип) внести **15 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси и **1 мкл** ПКО (положительный контрольный образец) и **9 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O.
8. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

**Второй способ:**

1. Внести в пробирку для ПЦР **100 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O.
2. Добавить **2 мкл** цельной крови.
3. Перемешать содержимое на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
4. Разморозить пробирки с **РС** и **СП**, перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
5. В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешать необходимый объем **РС** и **СП** (согласно таблице 2), перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
6. Внести в пробирки для ПЦР (планшеты, стрипы) по **15 мкл** приготовленной рабочей реакционной смеси.
7. Используя наконечники с аэрозольным барьером, внести **2 мкл** приготовленного раствора кровь/H<sub>2</sub>O.
8. Общий объем довести до **25 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O.
9. В одну из пробирок (планшеты, стрипы) с приготовленной рабочей реакционной смесью внести **10 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O (отрицательный контрольный образец), в другую пробирку (планшет, стрип) **1 мкл** ПКО (положительный контрольный образец) и **9 мкл** деионизованной H<sub>2</sub>O.
10. Закрыть ПЦР пробирки.
11. Перемешать содержимое микропробирок на вортексе и центрифугировать для сброса капель. Убедиться в отсутствии пузырей в пробирках.

**3.3. Проведение амплификации**

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

Температура	Время	
95 <sup>0</sup> С	3 мин	35 циклов
95 <sup>0</sup> С	10 сек	
63 <sup>0</sup> С	40 сек	
72 <sup>0</sup> С	20 сек	
60 <sup>0</sup> С	10 мин	

ПЦР-продукты можно хранить неделю в защищенном от света месте при +2...8<sup>0</sup>С. В случае длительного хранения при -20<sup>0</sup>С.

#### 4. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (НАНОФОР 05)

Для получения профиля проводится фрагментный анализ – электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «Gilbert Syndrome».

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

##### 4.1. Проведение спектральной калибровки

1. В отдельной пробирке смешать 80 мкл Ди-формамида и 8 мкл раствора СК-5, 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 пробирки. При необходимости удалить пузыри со дна лунок (пробирок) кратким центрифугированием.
3. Установить 96-луночный планшет или стрипованные пробирки в прибор для капиллярного электрофореза.
4. Провести калибровку по стандартному протоколу для СК-5.

##### 4.2. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

1. Приготовить смесь Ди-формамида и размерного стандарта СД-240 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Ди-формаמיד	10
Стандарт длины СД-240	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.

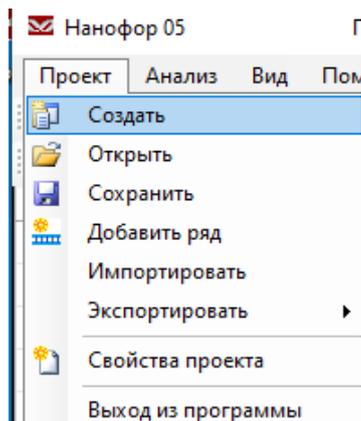
**ВАЖНО!!!** Инъекция образцов происходит из восьми лунок ряда одновременно. Не допускается запуск прибора, если в анализируемом ряду имеется хотя бы одна незаполненная лунка! В пустые лунки, не содержащие образцы, следует внести по 10 мкл формамида.

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

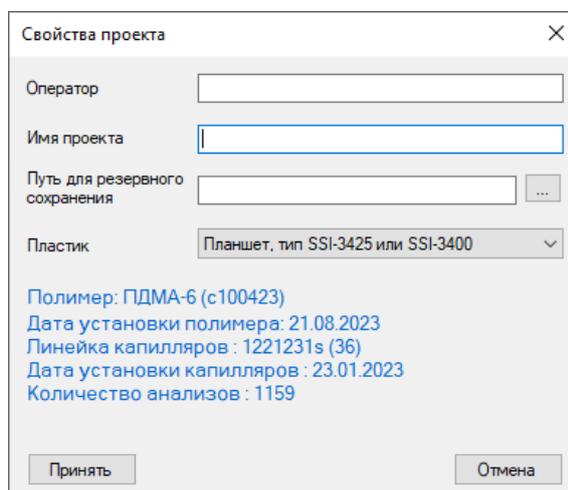
##### 4.3. Запуск фрагментного анализа

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

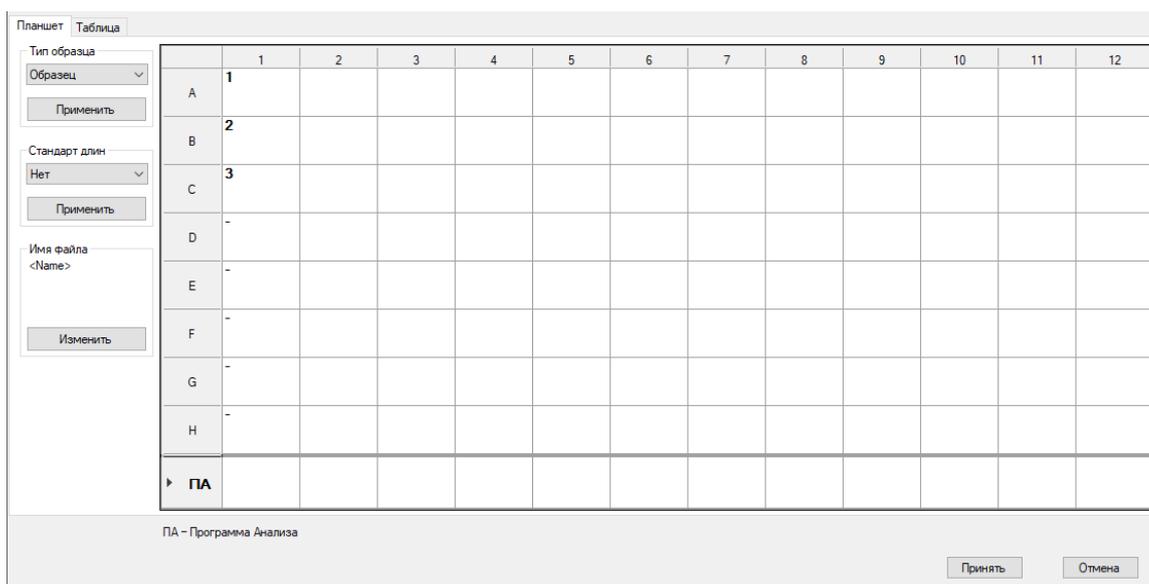
1. Открыть программу SeqPI, в верхнем меню нажать кнопку «Проект». В открывшейся вкладке выбрать «Создать».



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 – Gilbert Syndrome**» использовать его. Если модуль не установлен использовать следующие значения: тип анализа – «**Фрагментный**», модуль управления – «**FA\_450**», набор красителей- «**СК-5**»

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

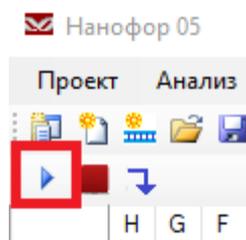
Длина капилляров	36 см		50 см	
Вид полимера	ПДМА-4	ПДМА-6	ПДМА-4	ПДМА-6
Напряжение ввода пробы [В]	3000	3000	3000	3000
Время ввода пробы [сек]	5	5	5	5
Напряжение электрофореза [В]	12200	12200	12200	12200
Время электрофореза [сек]	1300	2000	2600	4000
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	600	650	1000	1100

**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 – Gilbert Syndtome**» и нажмите «**Сохранить**». В дальнейшем для запуска будет достаточно выбрать модуль управления – «**Syntol – Gilbert Syndrome**».

6. В правом нижнем углу нажать кнопку «**Принять**».

7. Кликнуть по клавише запуска электрофореза.



## 5. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (AB3500/AB3500XL)

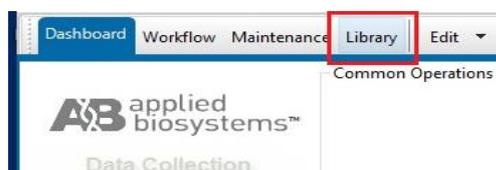
### 5.1. Проведение спектральной калибровки

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

#### 5.1.1. Создание DyeSets

1. Открыть программу **Data Collection Software**.

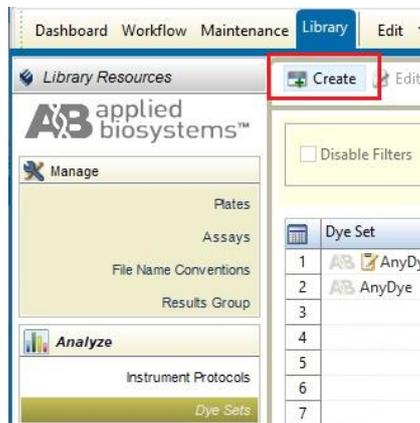
2. Кликнуть по иконке «**Library**» в левом верхнем углу окна.



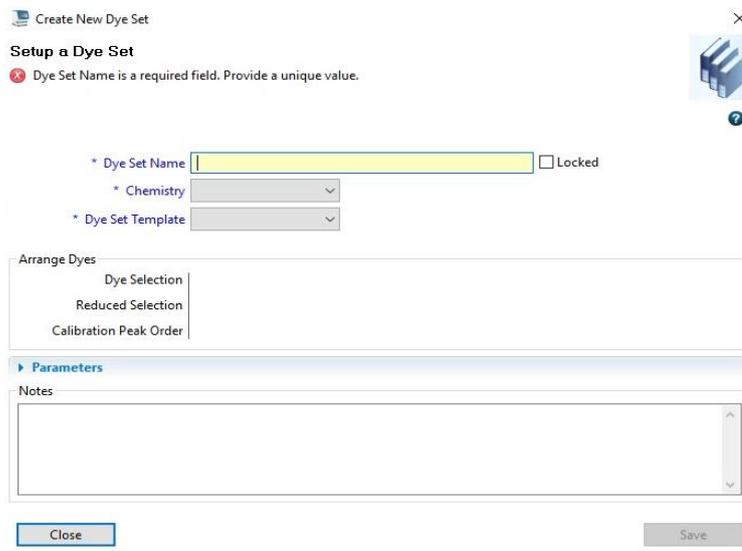
3. В разделе «**Analyze**» выбрать вкладку «**DyeSets**».



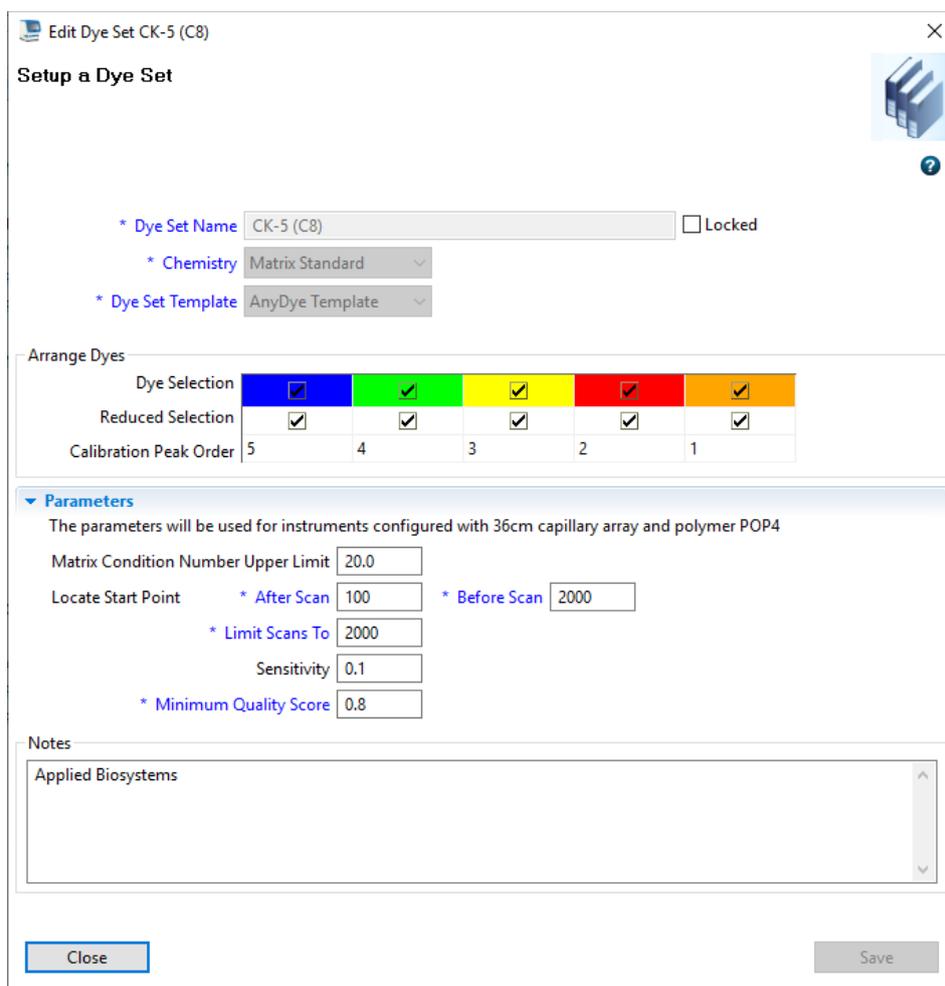
4. В верхней части нажать кнопку «Create».



5. В открывшемся окне в поле «Dye Set Name» написать **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-формаид** и раствор **СК-5** по протоколу:

	<b>AB3500</b>	<b>AB3500XL</b>
<b>Ди-формаид</b>	80 мкл	240 мкл
<b>СК-5</b>	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.

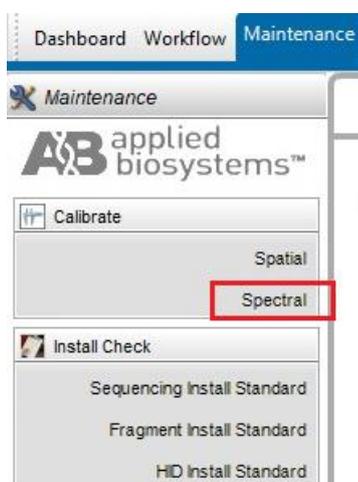
4. Установить 96-луночный планшет или стрипованные пробирки, с раствором калибратора СК-5 в прибор для капиллярного электрофореза.

### 5.1.3. Запуск спектральной калибровки

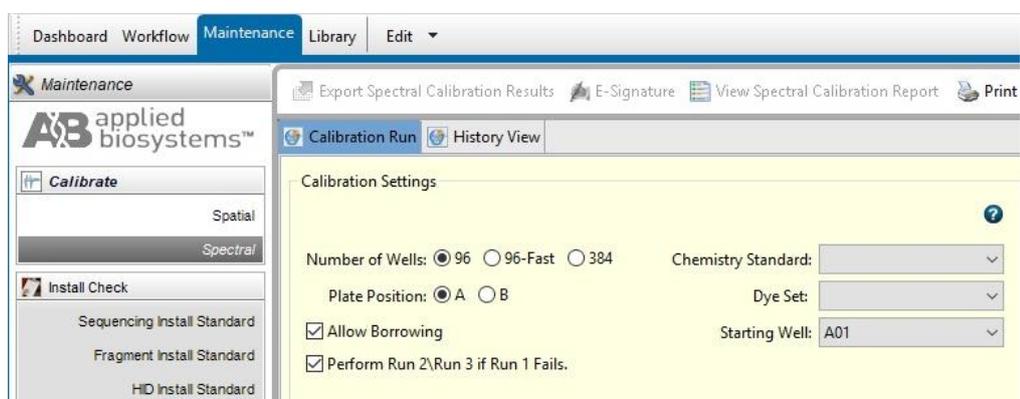
1. Открыть программу Data Collection Software. Кликнуть по кнопке «Maintenance» в верхней строке или «Wizard».



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



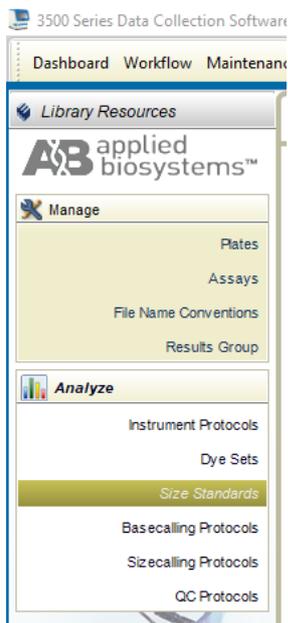
3. В открывшемся окне «Calibration Run», указать «Number of Wells» - количество лунок в используемом планшете, «Plate Position» - позицию планшета в приборе, в поле «Chemistry Standard» из выпадающего списка выбрать **Matrix Standard**, в поле «Dye Set» из выпадающего списка выбрать **СК-5**, а в поле «Starting Well» указать номер первого стрипа в планшете, который содержит смесь калибратора.



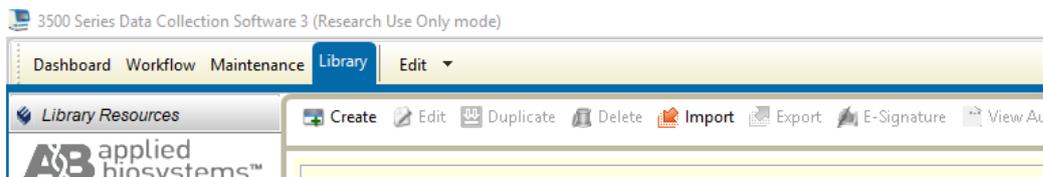
4. Нажать на кнопку «Start Run» для запуска спектральной калибровки.
5. После завершения калибровки нажать кнопку «Accept» в нижней части окна.

## 5.2. Создание “Size Standarts”

1. В разделе “**Analyze**” выбрать вкладку “**Size Standarts**”



2. В верхней части нажать на кнопку “**Create**”



3. В открывшемся окне в поле “**Size Standart**” написать **SS-240**, в поле “**Dye Color**” из выпадающего списка выбрать “**Orange**”. Ниже в поле “**Enter new size Standart definition**” вписать длины размерного стандарта. (пример на фото ниже).

Create New Size Standard

Setup a Size Standard

Size Standard Definition cannot be empty.

\* Size Standard: SS-240  Locked

Description:

\* Dye Color: Orange

Enter sizes in the field below separated by a comma, space, or return then click the "Add Size(s) >>" button to add them to the current size standard definition.

Enter new Size Standard definition: (e.g. 11.0, 34.2, 55)

60  
70  
80  
90  
100  
120  
140  
160  
180  
200  
220  
230  
240

Add Size(s) >>

\* Current Size Standard definition: Delete Selected Sizes

Close Save

4. После заполнения длин размерного стандарта необходимо нажать на **“Add Size(s)”**, после чего прописанные длины размерного стандарта отобразятся в правом окне **“Current Size Standard definition”**. После этого следует нажать **“Save”**

Create New Size Standard

Setup a Size Standard

\* Size Standard:   Locked

Description:

\* Dye Color:

Enter sizes in the field below separated by a comma, space, or return then click the "Add Size(s)>>" button to add them to the current size standard definition.

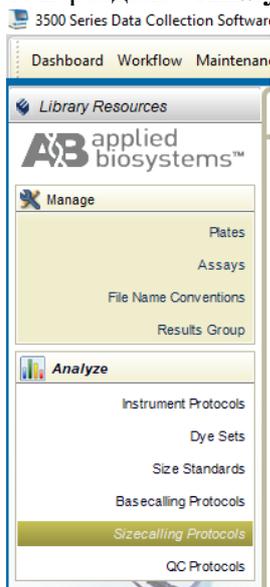
Enter new Size Standard definition: (e.g. 11.0, 34.2, 55)

\* Current Size Standard definition:

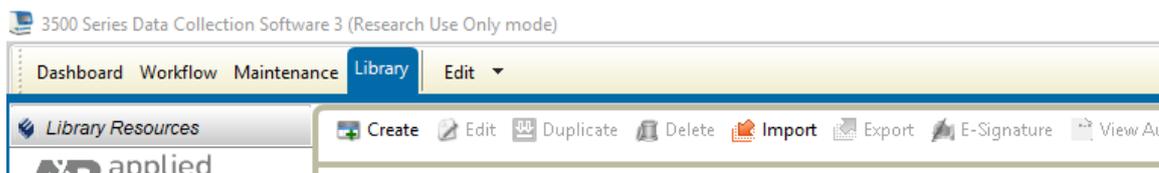
60.0  
70.0  
80.0  
90.0  
100.0  
120.0  
140.0  
160.0  
180.0  
200.0  
220.0  
230.0  
240.0

### 5.3. Создание **“Sizecalling protocols”**.

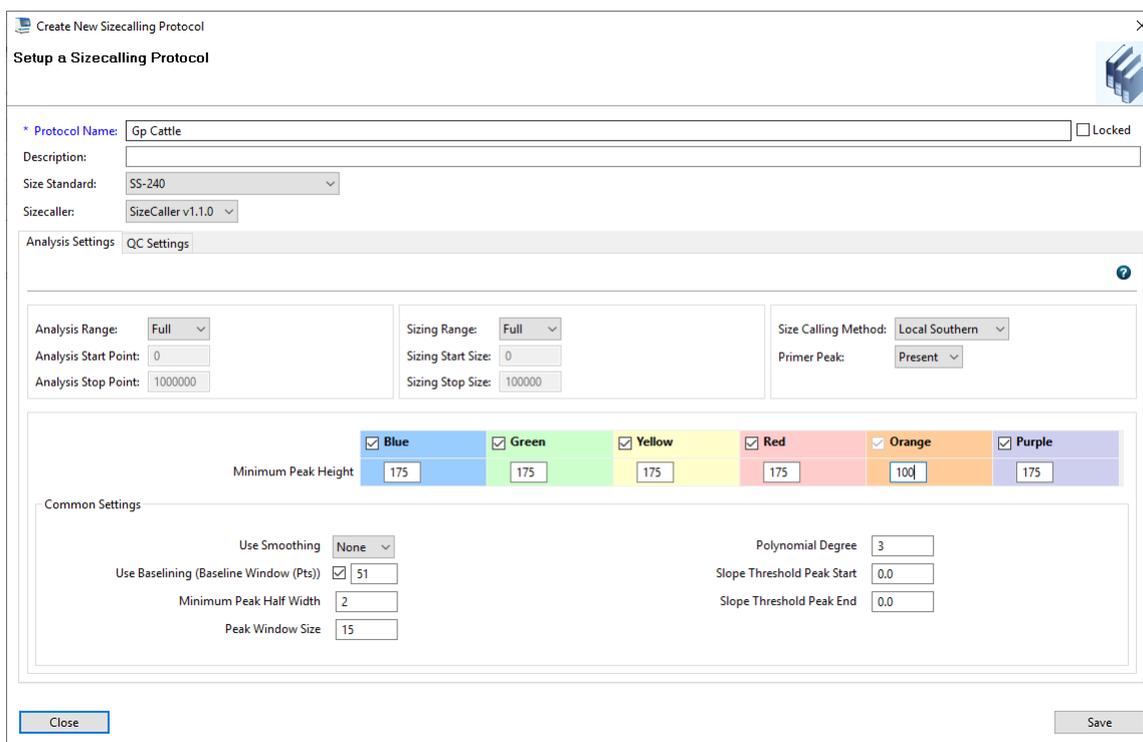
1. В разделе **“Analyze”** выбрать вкладку **“Sizecalling protocols”**.



2. В верхней части нажать на кнопку **“Create”**

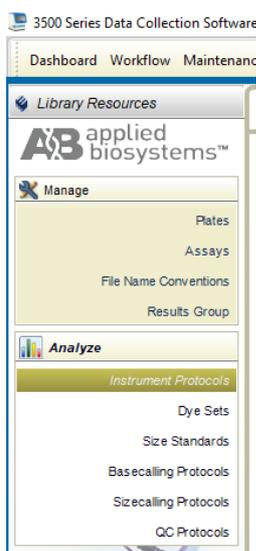


3. В открывшемся окне в поле “**Protocol name**” написать **Gilbert Syndrome**, в поле “**Size Standart**” из выпадающего списка выбрать **SS-240**. В поле “**Minimum Peak Height**” выставить высоты пиков как указано на фото ниже. Нажать “**Save**”

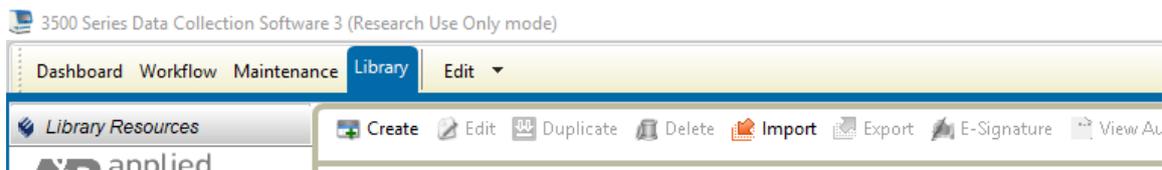


### 5.4. Создание “Instrument Protocol”.

1. В разделе “**Analyze**” выбрать вкладку “**Instrument Protocols**”



2. В верхней части нажать на кнопку “**Create**”

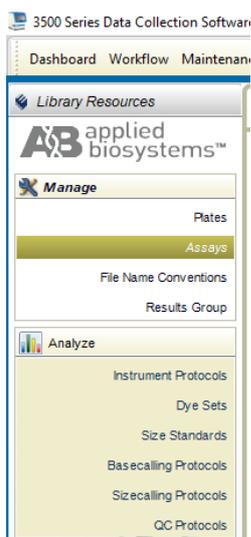


3. В открывшемся окне в поле “**Application type**” из выпадающего списка выбрать “**Fragment**”.
4. В поле “**Capillary length**” из выпадающего списка выбрать ту длину линейки капилляров, которая на данный момент установлена в приборе.
5. В поле “**Polymer**” из выпадающего списка выбрать тот полимер, который на данный момент установлен в приборе.
6. В поле “**Dye Set**” из выпадающего списка выбрать **CK-5**
7. В поле “**Run Model**” из выпадающего списка выбрать модуль “**FragmentAnalysis**”, далее в поле “**Protocol name**” написать **Gilbert Syndrome**. После чего установить параметры электрофореза, которые приведены на фотографии ниже.

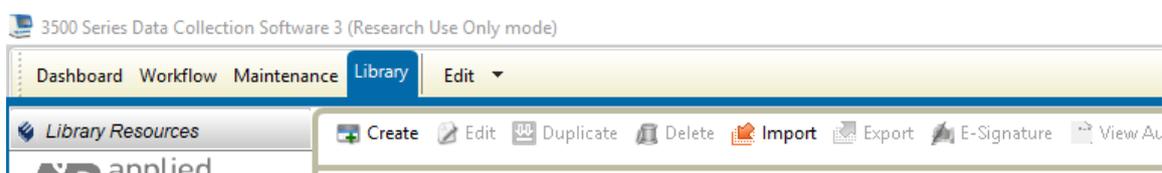
**Важно:** Время электрофореза “**Run Time**” и время исключения регистрации электрофореза “**Data Delay**” зависит от типа полимера и длины линейки капилляров и настраивается пользователем в зависимости от используемой комбинации капилляров и полимера.

### 5.5. Создание “Assay”

1. В разделе “**Manage**” выбрать вкладку “**Assays**”



2. В верхней части нажать на кнопку “Create”



3. В поле “Assay Name” написать **Gilbert Syndrome**, далее в поле “Application Type” из выпадающего списка выбрать “**Fragment**”.
4. В поле “Instrument Protocol” из выпадающего списка выбрать **Gilbert Syndrome**
5. В поле “Sizecalling Protocol” из выпадающего списка выбрать **Gilbert Syndrome**
6. Далее нажать “Save”.

The screenshot shows the 'Create New Assay' dialog box. The title is 'Create New Assay' and the subtitle is 'Setup an Assay'. There is an 'Assay Setup Help' link. The 'Assay Name' field contains 'Gilbert Syndrome'. There is a 'Locked' checkbox and a 'Color' dropdown set to 'Black'. The 'Application Type' dropdown is set to 'Fragment', and there is a 'Disable Filters' checkbox. Under the 'Protocols' section, there is a question: 'Do you wish to assign multiple instrument protocols to this assay?' with 'No' selected. Below this, there are two rows for protocols: 'Instrument Protocol' and 'Sizecalling Protocol', both set to 'Gilbert Syndrome'. Each row has 'Edit' and 'Create New' buttons. At the bottom, there are 'Close' and 'Save' buttons.

## 5.6. Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Приготовить смесь Ди-формамида и размерного стандарта СД-240 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
Ди-формамид	10
Стандарт длины СД-240	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.

**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.

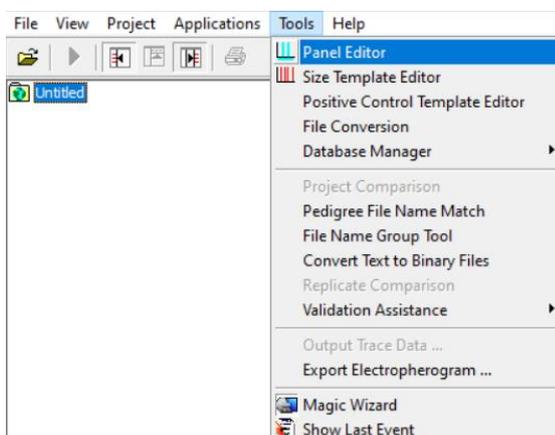
## 6. АНАЛИЗ ДАННЫХ

### 6.4. Анализ данных в программах GeneMarker и GeneMarker HID

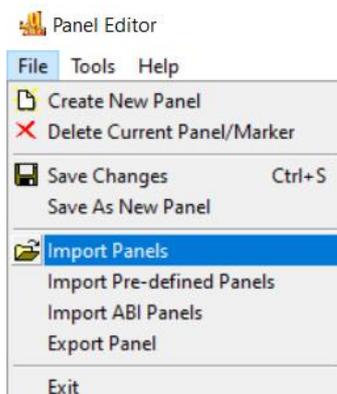
#### 6.1.1. Импорт файлов для анализа данных

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

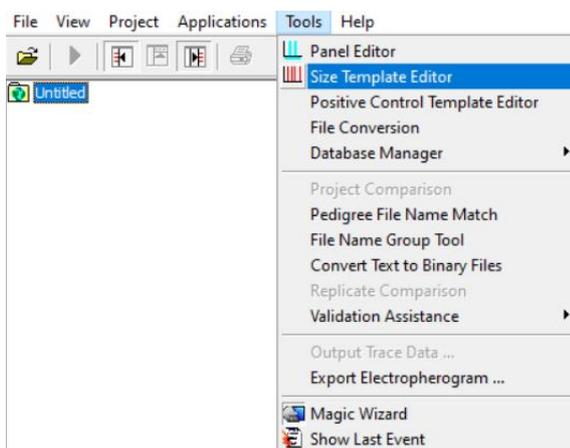
1. Запустить программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**. В верхнем меню выбрать «**Tools**», в выпавшем списке «**Panel Editor**».



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



3. Выбрать папку с файлом панели (Gilbert Syndrome) 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».



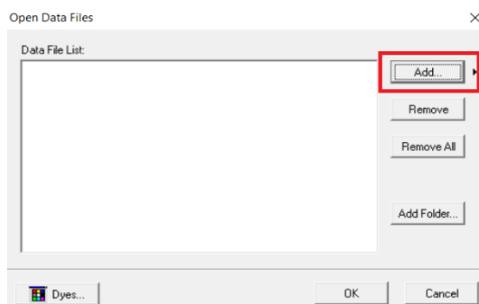
7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (СД-240) и подгрузить его в программу **GeneMarker/ GeneMarker HID**.
8. Закрыть окно «Size Template Editor».

### 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 «OK».

4. Кликнуть по «Run» в окне «Run». Или запустить анализ нажав на клавишу «Run Project» в верхнем меню.

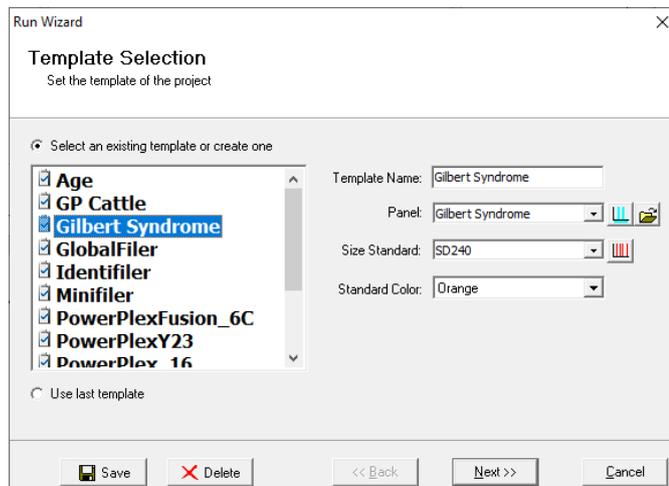


5. В открывшемся окне «Run Wizard» из списка шаблонов выбрать шаблон (template) для модификации, нажать на него левой кнопкой мыши. Для программы **GeneMarker** в графе «Analysis Type» выбрать тип анализа «Fragment», в **GeneMarker HID** такой опции нет. В графе «Panel» выбрать панель «Gilbert Syndrome», в графе «Size Standard» выбрать размерный стандарт «СД-240», указать цвет краски размерного стандарта и дать новое имя шаблону, например, «Gilbert Syndrome». Нажать «Next».

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

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

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



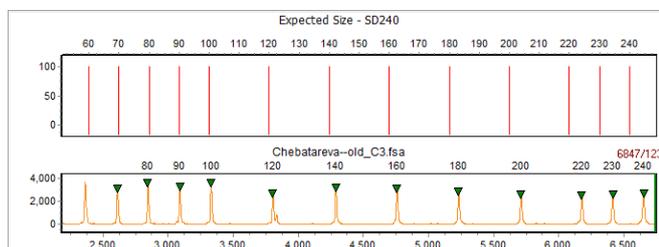
2. В открывшемся окне «**Calibration Charts**» проверить все образцы по списку и убедиться, что оценка качества размерного стандарта не ниже 96 баллов из 100. Если это верно для всех образцов, то дальнейшие действия не требуются, окно можно закрыть.

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

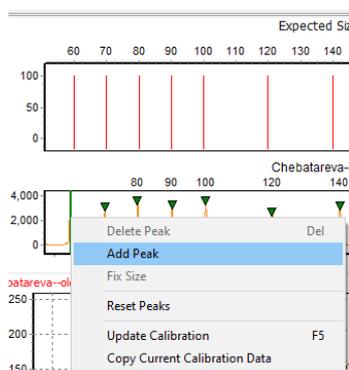
3. Если для каких-то образцов оценка качества размерного стандарта ниже 96 баллов, его нужно проверить, и, возможно, переподписать. Для этого, в списке образцов выбрать нужный образец нажатием левой кнопки мыши.

No.	Sampl...	Score
1	Cheb...	84
2	Cheb...	98
3	Kono...	98
4	Kono...	98
5	Shtuk...	98
6	Shtuk...	98

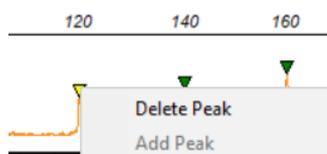
4. Справа верхний график – это виртуальный размерный стандарт, построенный программой для проверки, на него нужно ориентироваться визуально. График ниже – размерный стандарт выбранного образца. Нужно убедиться, что паттерн подписанных пиков нижнего графика совпадает с паттерном пиков верхнего графика.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



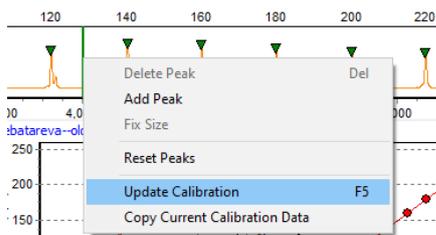
5. Если на каких-то пиках треугольников не хватает, нужно их проставить, нажав правой кнопкой мыши на нужный пик и выбрав в выпавшем меню «**Add Peak**». Для удобства график можно масштабировать.



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



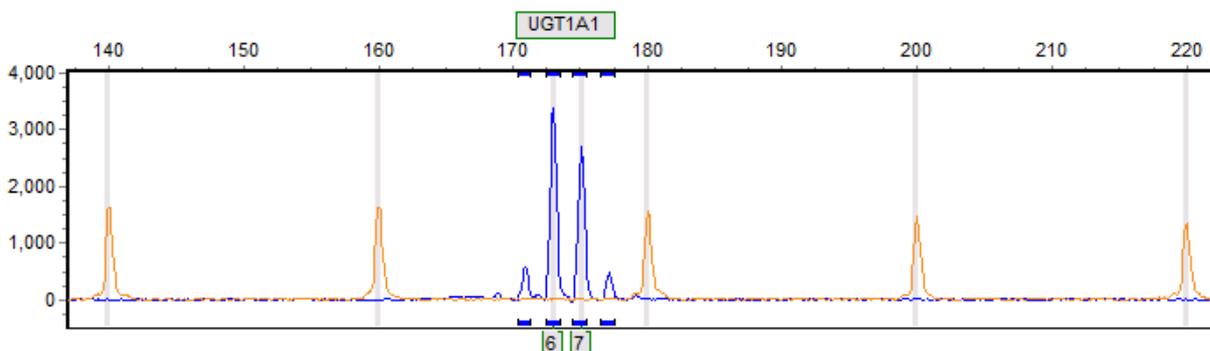
7. По окончании корректировки пиков стандарта выбранного образца, нужно правой кнопкой мыши нажать на свободное поле между пиками и в выпадающем меню выбрать «**Update Calibration**». Повторить процедуру для всех образцов, качество размерного стандарта которых ниже 96 баллов. Закрыть окно «**Calibration Charts**» и 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 жёлтые или красные подписи пиков, при условии, что они верные, их нужно принять. Правой кнопкой мыши нажать на пустое поле графика, без пиков, и в выпавшем меню выбрать «Confirm all».

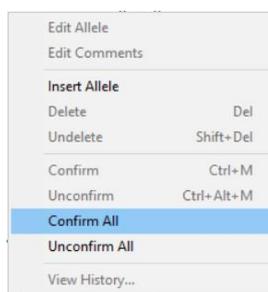
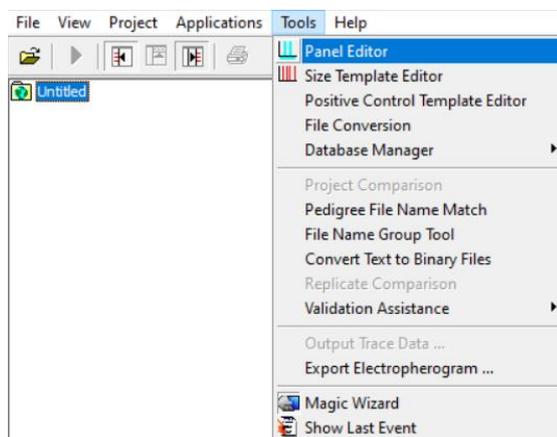


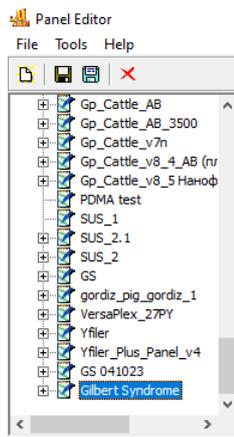
Таблица 3. Аллельное состояние положительного контрольного образца (ПКО)

Канал детекции	Лocus	Хромосомная локализация	Аллельное состояние
FAM	UGT1A1	2	6
			7

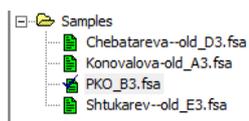
5. Если присвоенные значения аллелей не соответствует значениям в таблице, необходимо настроить панель.
6. Для настройки панели необходимо в верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor».



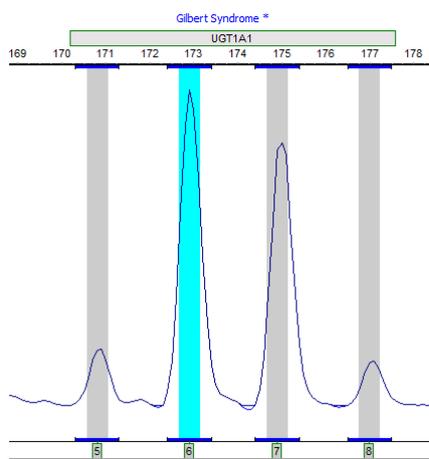
7. В списке панелей слева выбрать панель для редактирования. Если используете программу **GeneMarker HID**, то не выбирайте самую верхнюю панель. Нужная панель находится в общем списке по алфавитному порядку.



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



9. 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.



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

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

### 6.1.5. Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

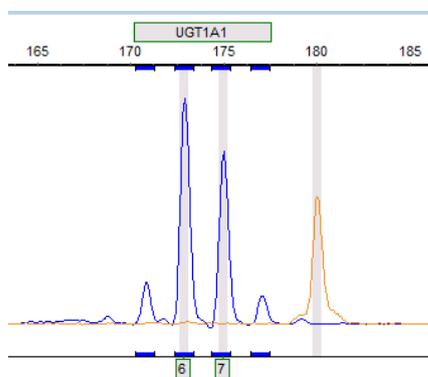
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с **ОКО**.
2. Убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

### 6.1.6. Анализ образцов

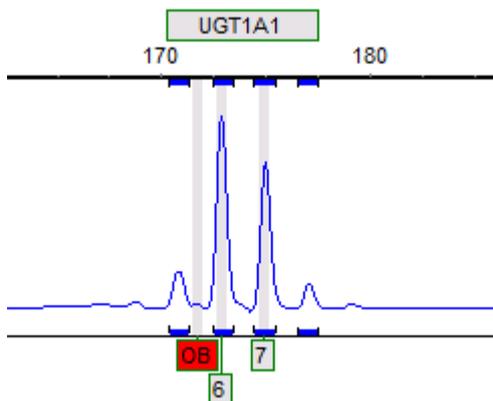
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу образца.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал используя клавишу «**Show Dye**»
3. Убедиться, что всем пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля.

### 6.1.7. Исключение из анализа статтеров и артефактных пиков

Локус, представленный в наборе, несет 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.

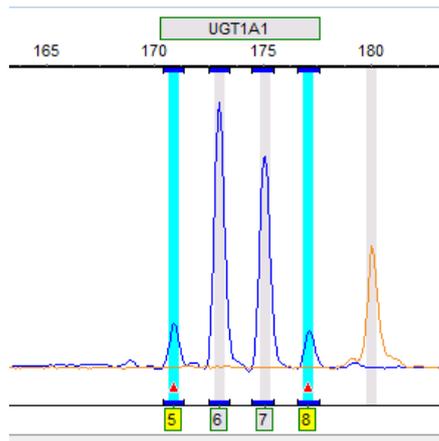


Также, возможно присутствие артефактных пиков, связанных с постановкой амплификации напрямую (минуя стадию выделения ДНК).

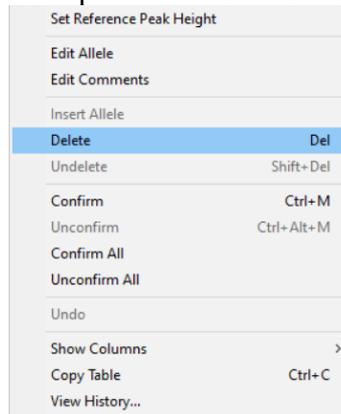


Для исключения из анализа статтеров и артефактных пиков нужно:

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



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

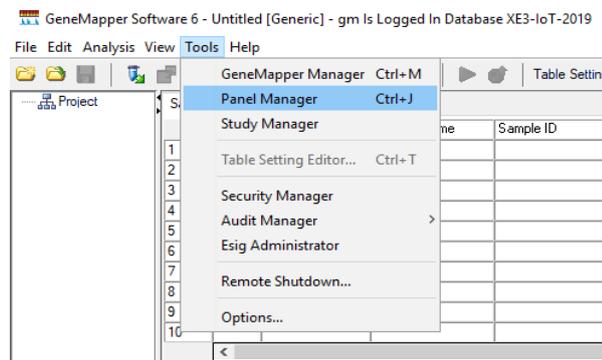


## 6.2. Анализ данных в Gene Mapper

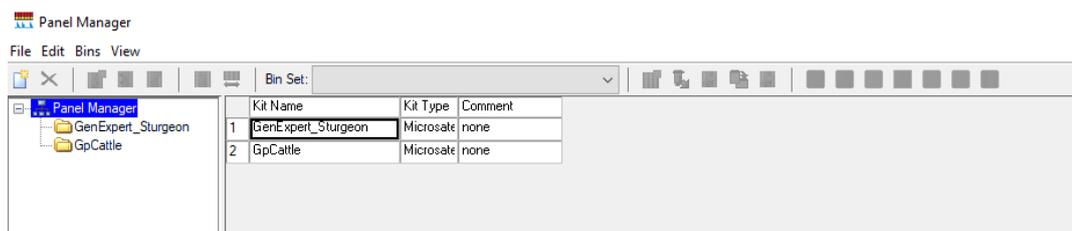
### 6.2.1. Импорт файлов для анализа данных

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

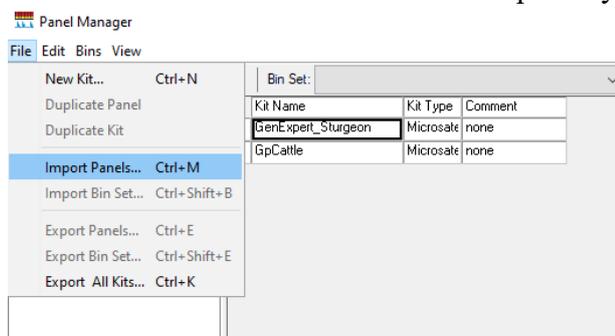
- Запустить программу **GeneMapper Software 6** в верхнем меню нажать «Tools» в выпавшем списке выбрать «Panel Manager».



- В открывшемся окне слева нажать «Panel Manager».

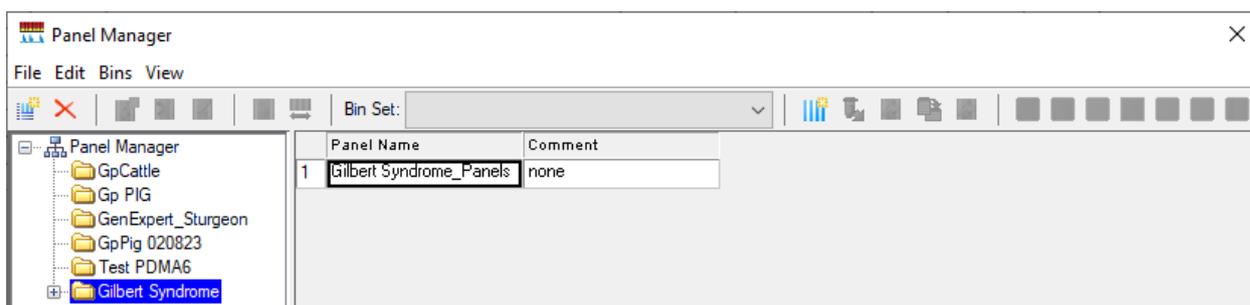


3. В верхнем меню нажать «**File**» в выпавшем списке выбрать пункт «**Import Panels**».

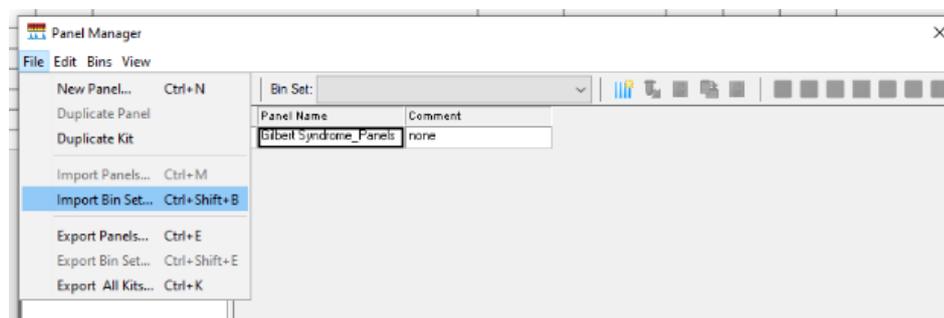


4. Выбрать папку с файлом панели (Gilbert Syndrome\_Panels) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».

5. Щелкнуть по папке Gilbert Syndrome появившейся в списке «**Panel Manager**»

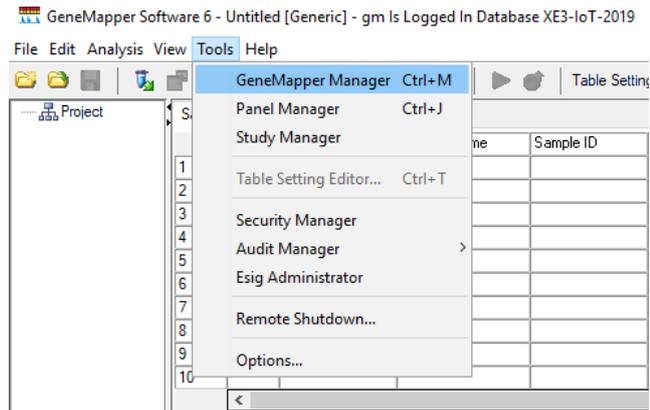


6. В верхнем меню нажать «**File**» в открывшемся списке выбрать пункт «**Import Bin Set**».

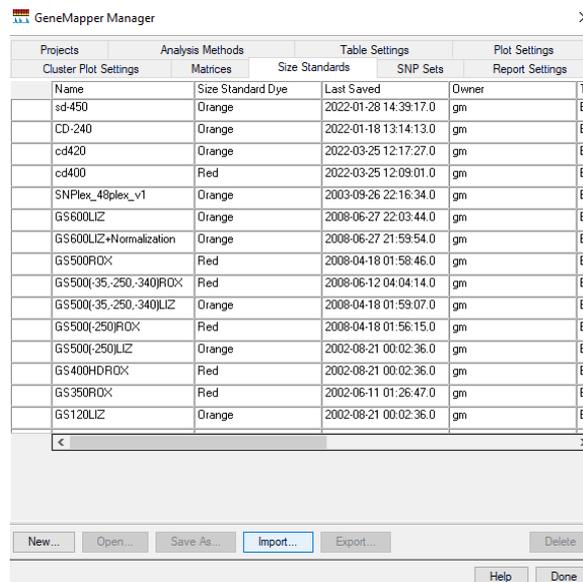


7. Выбрать папку с файлом бинов (Gilbert Syndrome\_bins) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**Panel Editor**».

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

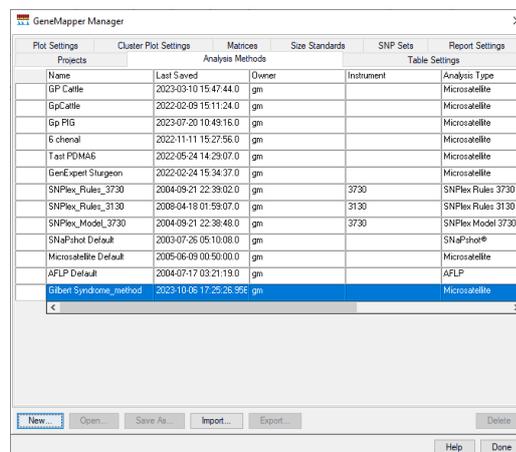


9. В верхней строке открывшегося окна перейти на вкладку «**Size Standards**» и нажать кнопку «**Import**».



10. Выбрать папку с файлом размерного стандарта (**СД-240**) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**».

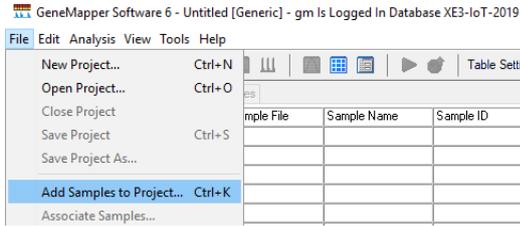
11. Перейти на вкладку «**Analysis Methods**» и нажать кнопку «**Import**».



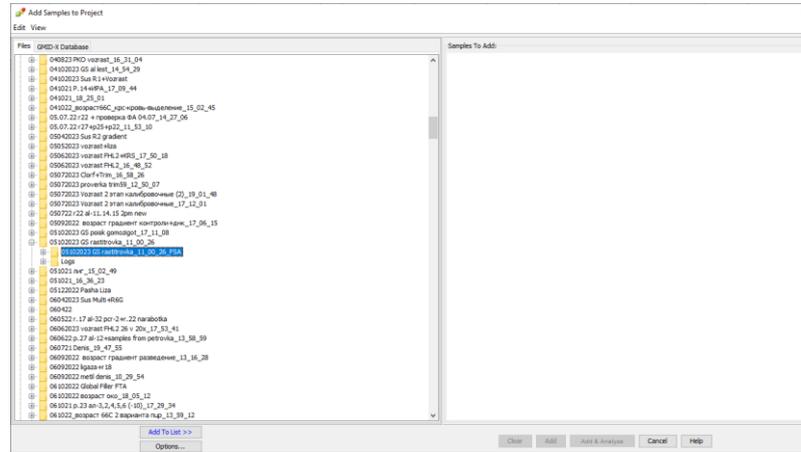
12. Выбрать папку с файлом метода (**Gilbert Syndrome\_method**) и подгрузить его в программу нажатием кнопки «**Import**». Закрыть окно «**GeneMapper Manager**».

6.2.2. Анализ данных

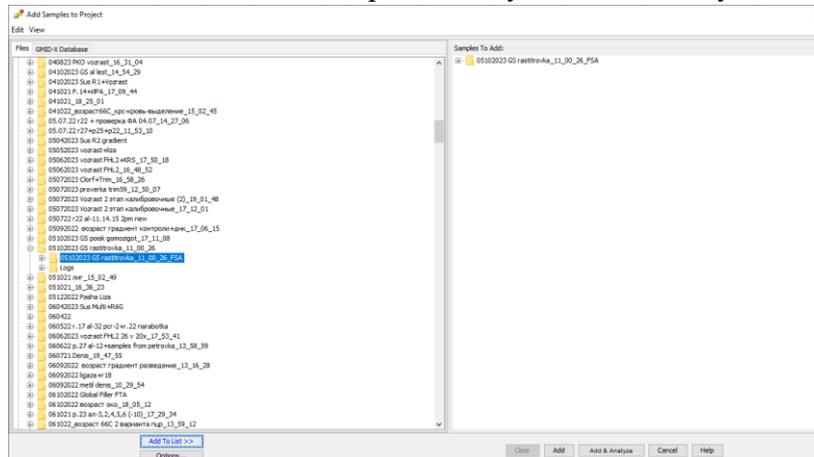
1. В программе **GeneMapper Software 6** в верхнем меню выбрать «**File**», в открывшемся списке выбрать «**Add Samples to Project**».



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



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



4. Для образцов выбрать ранее импортированные в программу: «**Panel**» – **Gilbert Syndrome**», «**Size Standard**» - **CD-240**, «**Analysis Method**» - **Gilbert Syndrome\_method**.

Status	Sample File	Sample Name	Comment	Sample T	SFN	Analysis Method	Panel	Size Standard	Matrix	SNP Set	Run Item	Instrument	Instrument	Run Date	REF	SQL	S/NF
1	Isaev 0.5 ng_A2.fsa	Isaev 0.5 ng	None	Sample	NA	Gilbert Syndrome_method	Gilbert Syndrom	CD-240			05102022	ABI3130	ga3130a1	2023-10-			
2	Isaev 0.5 ng_B2.fsa	Isaev 0.5 ng	None	Sample	NA	Gilbert Syndrome_method	Gilbert Syndrom	CD-240			05102022	ABI3130	ga3130a1	2023-10-			
3	Isaev 1 ng_U1.fsa	Isaev 1 ng	None	Sample	NA	Gilbert Syndrome_method	Gilbert Syndrom	CD-240			05102022	ABI3130	ga3130a1	2023-10-			
4	Isaev 1 ng_H1.fsa	Isaev 1 ng	None	Sample	NA	Gilbert Syndrome_method	Gilbert Syndrom	CD-240			05102022	ABI3130	ga3130a1	2023-10-			

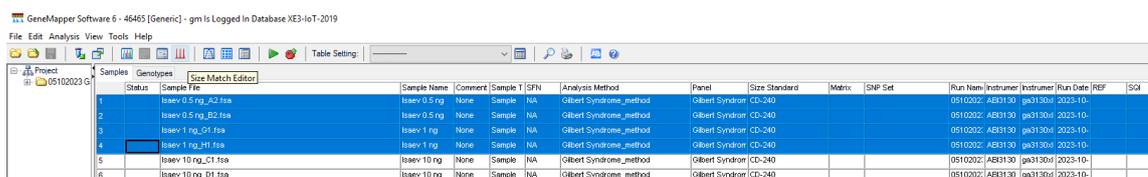
5. Запустить анализ.

### 6.2.3. Анализ размерного стандарта

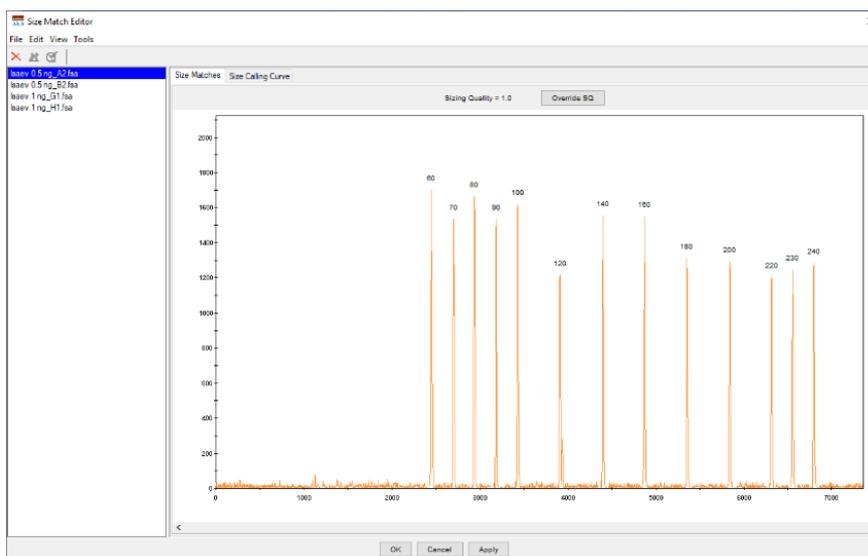
1. Необходимо убедиться, что во всех образцах правильно подписан размерный стандарт. Для этого, нужно проверить значения SQ для всех образцов в проекте. Если SQ – зелёный квадрат, то размерный стандарт этого образца подписан верно. Если SQ – жёлтый треугольник, или красный круг, то стандарт необходимо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

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

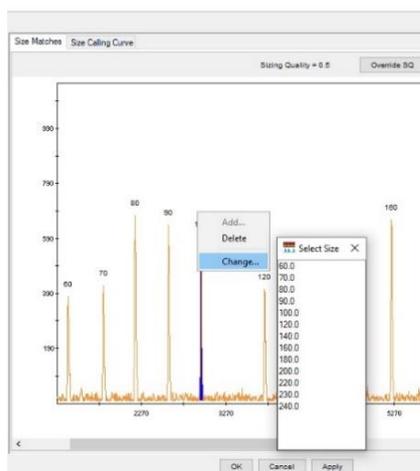
2. Для этого, нужно выделить все проверяемые образцы и в верхней панели нажать на кнопку «Size Match Editor».



3. В открывшемся окне из списка слева нужно 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 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 отключить все каналы, кроме синего. Убедиться в том, что всем пикам ПКО по данному каналу присвоено верное значение аллельного состояния (см. таблицу 4). Подписи лишних пиков нужно удалить, выбрав их нажатием левой кнопки мыши, с помощью кнопки «DELETE».

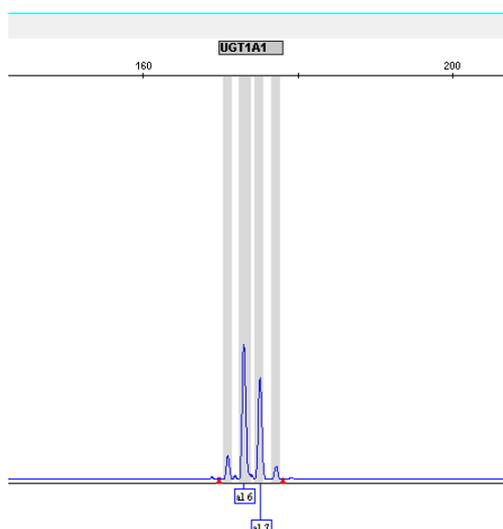
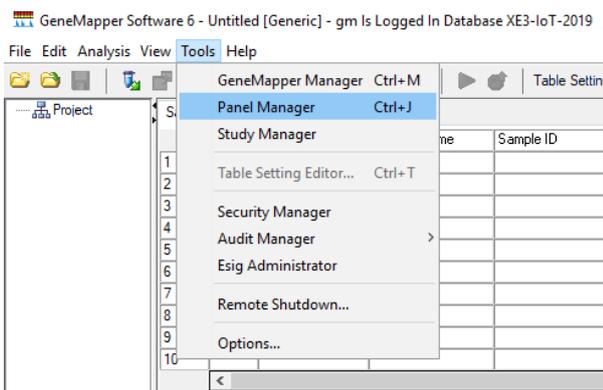


Таблица 4. Аллельное состояние положительного контрольного образца (ПКО)

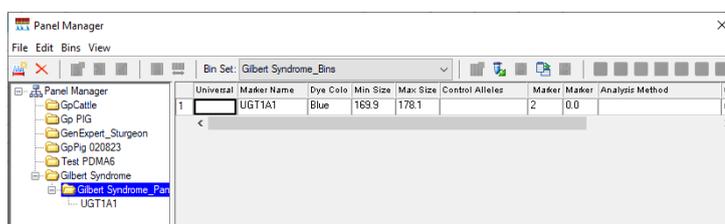
Канал детекции	Локус	Хромосомная локализация	Аллельное состояние
FAM	UGT1A1	2	6
			7

3. Если присвоенные значения аллелей не соответствует значениям в таблице, необходимо настроить панель.

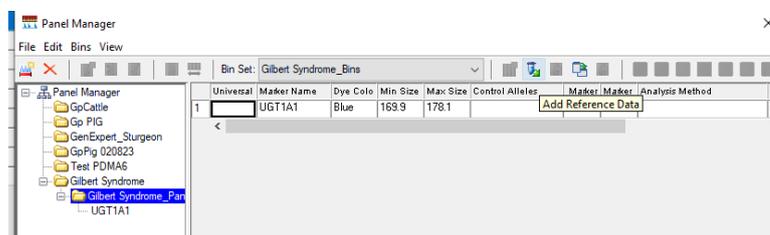
4. Для настройки панели необходимо закрыть окно с образцом. В верхнем меню выбрать «Tools» в открывшемся списке выбрать «Panel Manager».



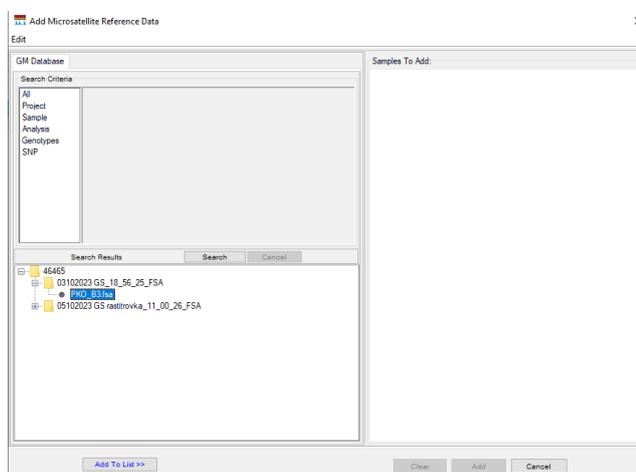
5. В открывшемся окне выбрать папку **Gilbert Syndrome**. В ней открыть папку **Gilbert Syndrome**, в результате отобразится локус.



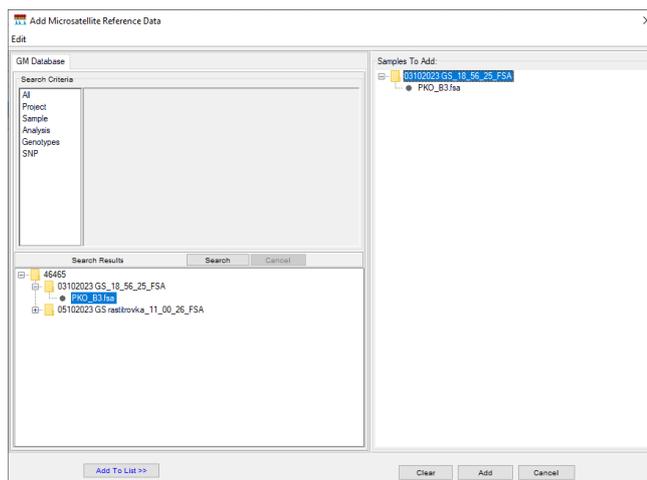
6. В верхнем меню нажать кнопку «Add Reference Data».



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

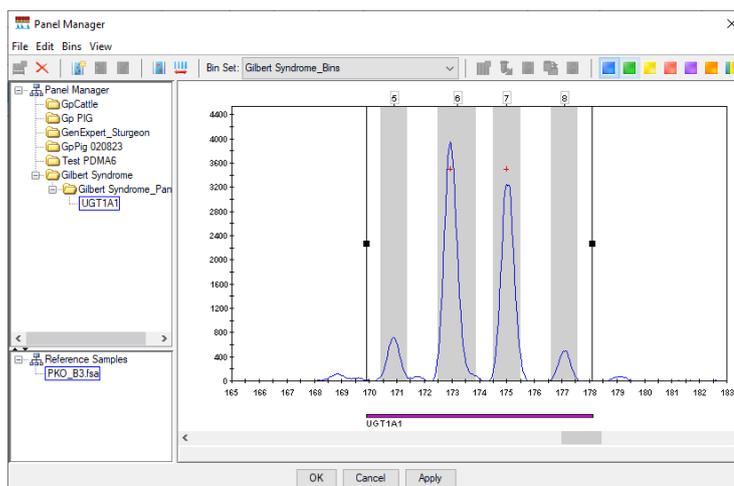


8. Справа появятся выбранные папка и файл. Внизу справа нажать кнопку «**Add**».



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. Повторить действия со всеми локусами, которым были неверно присвоены аллельные состояния.  
 14. 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

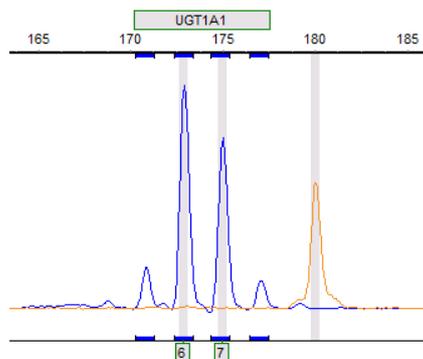
1. Открыть образец.

2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал.
3. Убедиться, что всем пикам анализируемого образца по данному каналу присвоено значение аллеля.

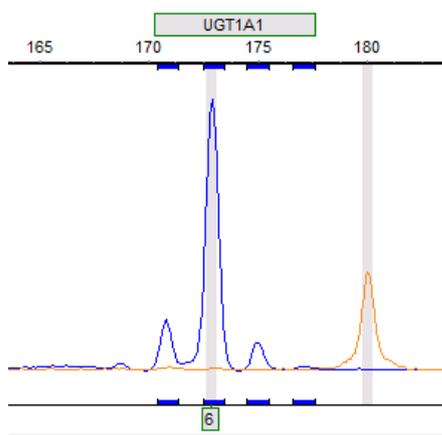
## 7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При анализе локуса необходимо учитывать следующие пункты:

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



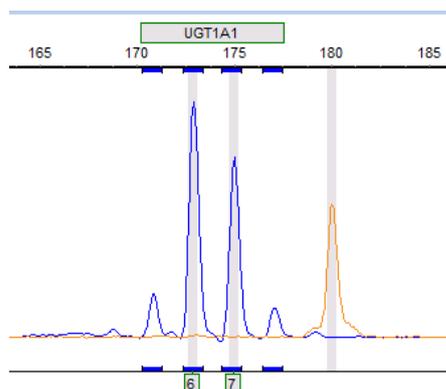
Гетерозиготный генотип (ТА)6 / (ТА)7



Гомозиготный генотип (ТА)6

- Локусы, используемые в наборе **Gilbert Syndrome** динуклеотидны (аллели локуса отличаются на 2 нуклеотида), в следствии 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 (ТА)6 / (ТА)7 с наложением статтера аллели 7 на аллель 6

В ходе исследования, помимо аллелей с (ТА)6-повторами (UGT1A1\*1) и (ТА)7-повторами (UGT1A1\*28), могут определяться редкие аллели: (ТА)5-повторов (UGT1A1\*36) – что свидетельствует о повышенной функции фермента, и (ТА)8-повторов (UGT1A1\*37) – когда активность УДФГТ1 значительно снижена.

Таблица 5. Возможные генотипы в гене *UGT1A1*

Ген	Генетический маркер		Возможные генотипы	
	<p><i>UGT1A1</i> УДФ1–                      глюкуронилтрансфераза 1                      UDP                      glucuronosyltransferase 1                      family, polypeptide A1                      OMIM ID: 191740</p>	ТА (n)	rs8175347	(ТА)5/(ТА)5
(ТА)5/(ТА)6				
(ТА)6/(ТА)6				
(ТА)5/(ТА)7				
(ТА)6/(ТА)7				
(ТА)5/(ТА)8				
(ТА)6/(ТА)8				
(ТА)7/(ТА)7				Клинически значимый генотип
(ТА)7/(ТА)8				
(ТА)8/(ТА)8				

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