# SSR Analyser

使用说明书

# 北京市农林科学院玉米研究中心 北京华生恒业科技有限公司

二零一四年七月

## 1. 安装 SSR Analyser

SSR Analyser 是植物(目前是二倍体)研究分析应用的 DNA 片段分析软件,旨在为该领域科研人员提供一个精确、快速、友好、自动化的数据分析平台。

### 1.1. 系统要求

#### (1) Windows® PC

操作系统: Windows® 98, NT, XP, Vista, Windows®7 处理器: Pentium® III, 1 GHz CPU 内存: 512MB 可用硬盘空间: 20GB

- (2) SSR Analyser 不支持 Linux 或者基于 UNIX 的操作系统。
- 1.2. 安装
  - (1) 双击 setup 文件。



(2) 单击 "Next", 直至 "Finish", 完成安装即可。



# 2. 数据分析流程

# 2.1. 启动程序

(1) 打开 SSR3 系统,	登陆本人账户,	点击"指纹分析器"。
-----------------	---------	------------

查询纳 样品条码	6件 9号		<ul> <li>▼ PCR</li> <li>◎ 电泳</li> <li>U 实验</li> <li>Q 上祥</li> </ul>	47年11 477増 (油核 (油核 (指纹 (板査询	1	羊品名和	F			Q查询	•
序号	样品条码号	▲ 样品名称	 ∳ 指纹	分析器		÷	样品类型	样品负责人	审核状态	镇定状态	操作
1	BGG2814	苏科糯4号	✓ Bake	ei设计	頃中 し		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	👁 🔒 🏛
2	BGG2815	中江王703	山实验	位点统计	种		杂交种	yangyang	正式审核	未锁定	👁 🔒 💼
3	BGG2816	燕单202	DNA提取	取功能	5¥中		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	👁 🔒 💼
4	BGG2817	丹科2151	◆ Exce ◆ 导入	el模板 DNA对照表	绿中		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	👁 🔒 🏛
5	BGG2818	丹王86	农	业部征集审定品	品种		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	👁 🔒 💼
6	BGG2819	东单11	农	业部征集审定品	品种		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	👁 🔒 🛅
7	BGG2820	东单13	农	业部征集审定品	品种		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	👁 🔒 🏛
8	BGG2821	东单60	农	业部征集审定品	品种		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	👁 🔒 💼
9	BGG2822	吉单327	农	业部征集审定品	品种		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	• • •
10	BGG2823	中农大369	农	业部征集审定品	神		杂交种	yangyang	临时审核	未锁定	👁 🔒 🏛

#### (2) 启动 SSR Analyser 程序。



## 2.2. 导入数据



夹进行批量分析。





## 2.3. 处理数据

SSR Analyser V1.1.6

- (1) 点击 主菜单 "Run Project" 图标, 弹出 Run Wizard 对话框, 启动数据自动分析工具。
- (2) 设置 Run Wizard 对话框的第一页参数,点击"MSSR"模板并选择电 泳数据对应的 Panel,点击"Next"按钮:
  - ① Template Name: 可以把所有分析参数保存成 Template。
  - ② Panel: 选择 Panel, 目前系统自带的适合玉米分析的 4 组引物组合, 包括 MQ1\_1.5、MQ2\_1.5、MQ3\_1.5、MQ4\_1.5。
  - ③ Size Standard: 选择内标, 默认为 GS500LIZ\_3730。
  - ④ Standard Color: 选择内标色带,默认为 Orange。
  - ⑤ Analysis Type: 分析类型默认为 Fragment (Plant)。

File View Project Applications ]	Tools Help			
📽 🖿 🕨 💽 💌 🖉		🔄 🕹 🔉 🕸 🔊 🖉 🖉 💶 📃 🖃		1
C C DISTORT				
C DI14000EE A01 view for	Distance in the			-
V HJ1400000_AU1_White	RJ1400055_A01_shm.fsa			×
D D 11400005 A02_VmLtsa				
PJ 1400057_403_0mm.rsa	0 200 400 -	Run Wizard	200 5,200 5,400 5,600	5,800
D D I 400000 A04 JAM. Isa				
FJ 1400003_405_0mm.rsa	15.000			
D DUI 400000 400 Unitsa		Template Selection		
	14,000	Set the template of the project		
E) FU1400063_AU3_Vmm.tsa				
D D11400005 A11 vitro for	13,000	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
F) F) 1400060_A11_yminisa				
	12.000			
[2] FU1400007_001_stim.tag		Select an existing template or create one		
D D1400000_002_vinitia				
P R1400003_003_003_000168	11,000	Template Name: MSSB		
B B11400071 B05 ubm ha		MOSK		
D B11400072 B06 ubm fra	10,000			
D B11400072 B07 ubm ina		Panet: M01_1.5		
- B BI1400074 B08 ybm fea	9 000			
- E1 E-11400075 E09 yhm fra		Circ Churdwith Control 17, 2720		
Ph B11400026 B10 yhm fra		Size Standard: GS500LIZ_3730		
B BJ1400077 B11 vhm faa	8,000			
P) BJ1400078 B12 vhm.fsa		Standard Color: Orange		
B BJ1400079 C01 vhm.fsa	7,000	standard Culor, orango -		
Ph BJ1400080 C02 vhm.fsa				
- El BJ1400081 C03 vhm.fsa	6 000	Analysis Type: Fragment (Plant)		
Fi BJ1400082_C04_vhm.fsa				
[b] FJ1400083_C05_yhm.fsa				
P BJ1400084_C06_yhm.fsa	5,000			
B BJ1400065_C07_yhm.fsa		Save X Delete		
🔁 RJ1400086_C08_yhm.fsa	4,000	C Use last template		
B FJ1400087_C09_yhm.fsa				
🖹 RJ1400088_C10_yhm.fsa	3.000			
B BJ1400089_C11_yhm.fsa				
B RJ1400090_C12_yhm.fsa	2.000			
B RJ1400091_D01_vhm.fsa	2,000			
P BJ1400092_D02_yhm.fsa				
🕃 BJ1400093_D03_yhm.fsa	1,000			
P BJ1400094_D04_yhm.fsa				
B RJ1400095_D05_yhm.fsa	o hand have been seen as a second		the second s	
		<< Back Next >> Lancel		
B] BJ1400097_D07_yhm.fsa	1 000			
	-1,000			
Di Hui 400100 Dito des fas				
Page Up Page Down				

(3) 设置 Run Wizard 对话框的第二页参数,可以按默认参数直接进行分析, 点击"Next"按钮:

- Raw Data Analysis: 对原始数据进行 Smooth(平滑)、Saturation (饱和峰校正)、Baseline(基线校正)、Pull-up(Pull-up 峰的 处理)、Spike(钉子峰处理)等一系列处理,目的是为了修正峰形, 并去掉一些杂峰。
- ② Size Call: 将 Raw Data 转化为 Size Data 的方式, 默认选择 Local Southern 方式。
- ③ Allele Call: 将 Size Data 进行一系列参数过滤得到最后的 Allele Data。
  - i. Auto Range: 勾选会自动选择要读 Peak 的范围, 否则手动设置 Start 和 End 的范围。
  - ii. Outside Marker——Min Intensity 和 Max Intensity: 设置 引物 Size 范围外 Peak 高度的最小和最大的阈值,小于 Min Intensity 或大于 Max Intensity 的 Peak 都不会被读出。
- iii. Percentage: 相对每个色带第 5%高的峰高度乘以比例以下的峰不会被读出。(例如 Blue 色带有 20 个峰, Percentage 设为 1,那么就以这个色带第 20\*5%=1 高的峰高度乘以 1%作为虑值,低于此高度以下的 Peak 不会被读出。)
- iv. Local Region: <u>高低峰比例设置参数</u>,每个 Marker 下最高峰 乘以比例作为高度虑值,低于此高度以上的 Peak 不会被读出。
- v. Stutter Peak Filter: 过滤掉由于 PCR 反应产生的 Stutter Peak, 设置的 left 和 right 比例是相对于主峰高度。
- vi. Diploid Filter: <u>二倍体过滤设置</u>,在每个 Marker 下按高度至 多留下 3 个最高的峰,第 3 个峰的过滤看是否高于第 2 个峰高 的 70%,如果 Marker 下有第 3 个峰,峰图中 label 没有边框, Table 中用 Non-Real Peak 标记, Report 中 size 前没有颜色 标记。



- (4) 设置 Run Wizard 对话框的第三页参数,可以按默认参数直接进行分析, 点击"Ok"按钮:
  - Peak Score: 是一种评估信噪比和峰形的算法,用 Score 值进行表现,默认参数为 Score 值<1 的 Peak 为 Reject 的 Sample 用红色显示,Score 值>1 且 Score 值<7 的 Peak 为需要 Check 的 Sample 用黄色显示,Score 值>7 的 Peak 为 Pass 的 Sample 用绿色显示。

Run Wizard			X
Additional Settings - Fragment (Pla Set additional options related to the different analysis typ	nt) Analysis ®		
Allelic Ladder: NONE	Ţ		
Allele Evaluation Peak Score: Reject < 1.00 Check 7.00 < Pass F AFLP - Unconlidence at Rightside: Score < 30			
	<< <u>B</u> ack	<u>k</u>	Cancel

## 2.4. 检查数据

 点击 主菜单"Size Calibration" 图标, 弹出 Calibration Charts 对 话框;检查每个样品的 LIZ 的 Score 值是否大于 95, 否则修改与 GS500LIZ\_3730 参照图不一致的 LIZ 的 Peak 峰图:



(2) 点击 主菜单"Panel Editor" 图标,弹出 Panel Editor 对话框;点击 Project Panel 节点中位点,如 P20,显示该位点所有样品的峰图;检 查该位点的所有 BIN 是否与主要峰图的位置保持一致,否则整体平移该 位点 Panel 的位置:



(3) 如果需要对个别位点的连续多峰、N+1 峰、2bp 邻峰、读峰阈值等参数 进行调整,在 Panel Editor 对话框的 Project Panel 节点中,选择一个 位点,如 P20,右键菜单点击"Edit...",弹出 Edit Marker 对话框并 可进行设置。

Edit Marker	
Marker Parameters	]
Marker Name: P20	
Nucleotide Repeats: 4	
Boundary: 164.5 To 197.2	
Maize Peak Recover	
Do Peak Recover from the size: 166.4	
N+1 Filter	
Call Left Peak 70 🛫 %	
Call Right Peak 70 🚖 炎	
Call Highest Peak	
Intensity Filter	
Minimum: 50 🛨 Maximum: 30000 🗲	
2bp Filter	
Left>Right: 50 🚖 %	
Right>Left: 70 🚖 %	
OK Cancel	

(4) 对步骤(2)(3)中的参数进行修改后,关闭 Panel Editor 对话框, 系统将自动对修改过的位点重新进行 "峰识别"分析。

## 2.5. 浏览数据

(1) 选择 主界面左侧"Navigator"对话框,右键菜单点击"Select Page", 系统将自动选择 4 个样品进行查看。



(3) 点击主界面左侧"Navigator" 对话框下方的"Page Up"或"Page Down",切换查看样品的图谱和指纹,Navigator 对话框显示不同样 品 fsa 列表信息,Image 对话框显示不同样品的图谱(峰图),Report 对话框显示不同样品的指纹数据:



[4] 浏览全部指纹数据,确定所有数据都没有问题后,点击 主菜単 "File− Save Project" 按钮,保存为 SGF 工程:

## 2.6. 上传数据

(1) 点击 主菜单"Upload Database" 图标,弹出 Submit Data to Database 对话框,再点击 Submit 按钮即可将样本的峰图和基因分型 数据上传到 SSR 数据库。

🖋 SSR Analyser ¥1.1.3 -	Q1test.SGF	
<u>File View Project Application</u>	s <u>T</u> ools <u>H</u> elp	
😂 🖹 🕨 🚺 🗷 🚺	🚍 👧 📒 🗸 🔍 🔍 🔯 🔛 📄 📃 🗹 🖆 🛍 📖 🕰 🖌 Marker:None	_
<ul> <li>Q1test.SGF</li> <li>Raw Data</li> <li>Allele Call</li> <li>RJ1400063_A09_yhm.fsa</li> <li>RJ1400070_B04_yhm.fsa</li> <li>RJ1400074_B08_yhm.fsa</li> <li>RJ1400075_B09_yhm.fsa</li> <li>RJ1400076_C08_yhm.fsa</li> <li>RJ1400102_D12_yhm.fsa</li> <li>RJ1400106_E04_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G05_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G06_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G06_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G06_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G01_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G01_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G01_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G01_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G01_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G01_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G01_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G01_yhm.fsa</li> <li>RJ1400132_G11_yhm.fsa</li> <li>RJ1400134_G08_yhm.fsa</li> <li>RJ1400134_G10_yhm.fsa</li> <li>RJ1400149_H11_yhm.fsa</li> <li>RJ1400149_H11_yhm.fsa</li> </ul>	RJ1400053_A09_yhm.fsa       00         Select Samples:       0         RJ1400076_A10_yhm.fsa       0         RJ1400076_B09_yhm.fsa       0         RJ1400075_B09_yhm.fsa       0         RJ1400076_B09_yhm.fsa       0         RJ1400075_B09_yhm.fsa       0         RJ1400102_D12_yhm.fsa       0         RJ1400132_G08_yhm.fsa       0         RJ1400132_G06_yhm.fsa       0         RJ1400133_G07_yhm.fsa       0         RJ1400133_G07_yhm.fsa       0         RJ1400133_G07_yhm.fsa       0         RJ1400133_G07_yhm.fsa       0         RJ1400133_G07_yhm.fsa       0         RJ1400133_G07_yhm.fsa       0         RJ1400133_G12_yhm.fsa       0         RJ1400139_H01_yhm.fsa       0         RJ1400139_H01_yhm.fsa       0         RJ1400149_H01_yhm.fsa       0         RJ1400149_H11_yhm.fsa       0         RJ1400149_H11_yhm.fsa       0	

(2) 数据上传的逻辑是: ① 上传数据:只上传不多于两个绿色 Peak 的数据。

- ② 上传图片:
  - i. 能够上传的样本颜色标识:黑色样本(在 Report 对话框中显示 为绿色图标、Real Peak 的 Peak)
  - ii. 不能够上传的样本颜色标识:优先级为 红色样本(红色的 Peak)>橙色样本(黄色的 Peak)>绿色样本(多于 2 个绿 色的 Peak)

# 3. 模板编辑器 (panel editor)

## 3.1. 概述

在 main analysis window 中点击菜单 Tools->Panel Editor 或者点击 Run Wizard Template Selection 窗口 panel Editor 图标启动 panel editor 或者 点击主工具栏上的 Panel Editor 图标。

用户可以使用 panel editor 生成和编辑 panel。



## 3.2. 位点编辑

右键点击 Panel 的某个 Marker, 弹出 Edit Marker 对话框,在此对话框 里可以对每个 Marker 进行个性化参数设置。

- (1) Marker Name: 设置 Marker 名字
- (2) Nucleotide Repeats: 设置碱基重复单元
- (3) Boundary: 设置 Marker 的边界范围
- (4) Peak Recover: 连续多峰算法,将几个相邻递增的峰的高度累加到最后 一个峰的算法,是否勾选决定此 Marker 下的 Peak 是否进行连续多峰 的累加。

- (5) Do Peak Recover from the size: 设置连续多峰算法分析的起点,即从 哪个 BIN 开始进行连续多峰累加。
- (6) N+1 Filter: N+1 峰的过滤算法,可以选择 Call Left Peak (读左边的 峰)、Call Right Peak (读右边的峰)或者 Call Highest Peak (读最 高峰)。读左或读右的算法有个高度默认为 70%的比例控制。
- (7) Intensity Filter: 设置引物 Size 范围内 Peak 高度的最小和最大的阈值, 小于 Min Intensity 或大于 Max Intensity 的 Peak 都不会被识别。
- (8) 2bp Peaks Filter: 间隔在差不多 2bp 范围的峰过滤,如果两个峰高是 left>right 默认用左峰 50%的高度过滤,如果是 right>left 默认用右锋 70%的高度过滤。

Edit Marker
Marker Parameters
Marker Name: P20
Nucleotide Repeats: 4
Boundary: 164.5 To 197.2
Maize Peak Recover
Do Peak Recover from the size: 166.4
M N+1 Filter
Call Left Peak 70 🚖 %
C Call Right Peak 70 🚖 %
Call Highest Peak
Intensity Filter
Minimum: 50 🜩 Maximum: 30000 🜩
2bp Filter
Left>Right: 50 🗢 %
Right>Left: 70 🗢 %
OK Cancel

## 3.3. Panel Tree

- 3.3.1 Panel Tree 的分类
  - (1) Project Panel: 当前工程使用的 Panel,此节点 Panel 的 Marker 可以移动、可以在 Edit Maker 里设置分析参数,修改过的 Marker 会重新Run 一遍。
  - (2) Panel Template: 安装包里所有 Panel 的模板,此节点 Panel 不能做 任何修改,包括移动、删除、参数设置等等。
  - (3) Customized Panel Template: 自定义新建的 Panel,此节点 Panel 可以进行任何修改,包括移动、删除、参数设置等等。



- 3.3.2 Panel Tree 的操作
  - (1) Create New Panel:从 File 菜单或者点击工具栏图标可以打开 Create New Panel 对话框,设置 Name 后点击 OK 就可以创建一个空的 Panel。

Create New Panel	×
Name:	
Type: Fragment (Plant)	•
Method	
Manually Create	
C Automatically Create	-
Use All Samples	
C Use Selected Samples	
OK Cancel	>>

(2) Add Marker: 选择新建 Panel 的节点右键点击 Add Marker 按钮,打 开 Add Marker 对话框,可以选择 Panel Template 里 Panel 的 Marker 进行重组生成新的 Panel。

Panel Template Markers:		Selected Markers:
P20	Add ->	P09 P08 P13
P11 P09 P08 P13 P01 P17 P16 P05	<- Remove	
105	Add All ->>	
1		1

(3) Intensity Setting: 选择新建 Panel 的节点右键点击 Intensity Setting 按钮,打开 Intensity Setting 对话框,可以对相同 Panel 的所有 Marker 的峰识别高度范围进行批量设置,具体含义见"Intensity Filter"。



(4) Export: 选择准备导出 Panel 的节点右键点击 Export 按钮,可以将该 Panel 保存为 XML 文件进行共享。

# 4. 内标编辑器 (Fragment Sizing Standards)

## 4.1. Size Template 编辑器

Size Template Editor 是 SSR Analyser 软件包中的一个工具,用来生成 和修改 size standard。启动 size template editor,选择 Tools-> Size Template Editor 或者在 Run Wizard Template 对话框中点击 Size Template Editor 图标。



## 4.2. Size Calibration Charts

Size calibration charts 工具用来帮助用户检查数据处理之后的 size call 是否正确。在 Main Analysis window 的主工具条中点击 size calibration charts 图标调出 size calibration charts 窗口。



# 5.报告打印

SSR Analyser 提供了打印功能,可以很方便的打印凝胶电泳图和峰信息表。 点击 Project->Print Report 或者点击工具栏 Print Report 图标即可调出 打印窗口。



# 6. 其他功能

## 6.1. 常用快捷键

- (1) Save Project > Ctrl + S
- (2) Inset Allele -> Insert 键
- (3) 启动 Run Wizard > F5
- (4) 打开数据上传对话框 -> F6
- (5)运行完 Run Wizard 后的历史记录,关闭该窗口 ->Enter 回车键

### 6.2. Allele 编辑

Allele chart 中右键菜单,可以对 Allele 进行 Insert、Edit、Delete、Confirm 等操作,另外,三峰进行二倍体过滤时可以通过设置 Set As RealPeak 和 Set As Non-RealPeak 选项,确定是否上传其基因分型数据。



## 6.3. Panel 同步

本地 Panel 自动与服务器上的 Panel 进行同步,如果同步失败会弹出一个消息框。



## 6.4. 系统图标

(1) 工具条图标

按钮	描述
ð	打开文件准备选择数据
	打开工程文件(.sgf)
	打开 Run Wizard
<b>I</b>	显示/隐藏样本列表
<b>X</b>	显示/隐藏合成胶图
F	显示/隐藏报告表
4	打印
•	将数据提交到 SSR 数据库

•	选择要显示的色带颜色
⊕ <b>(</b>	放大
0,	缩小
ř×.	设定坐标
<b>8</b>	全色显示

#### (2) Allele Call 图标

	显示 Calibration 图
8	显示峰信息表
	保存峰信息表
ш	打开 Panel Editor
▲ .	重新 call allele
Marker:None	基因座选择下拉菜单

# (3) Report 图标 ᢙ Report 显示的设置 □ 保存 Report 为 Excel (\*.xls) 或 Text (\*.txt) 文件 ★ 一键删除所有 Undetermined (红色标识) 的 Peak ✓ 一键确认所有 Check (黄色标识) 的 Peak, 使 Peak 的 Quality 从 Check (黄色) 变为 Pass (绿色)。

Report 🖀 🖬 🗙 🔀 Bin	
	M86 M87 G6
1	GeneTarker
2	
3	You are going to delete all undetermined allele peaks!
4	Jo you want to continue?
5	(
6	
7	RJ1400102_D12_yi
8	RJ1400106_E04_ył 189
9	RJ1400129_G03_yt 179 252.0
10	RJ1400131_G05_ył 169 🗙 284 🗙 284 165
Report 📓 🖬 🗙 🗸 🔪 Bin	
	M86 M87 G6
1	RJ1400063 A09 ył
2	GeneTarker
3	
4	You are going to confirm all checked allele peaks! Do you wont to continue?
5	V bo you want to continue:
6	[ 是 (0) ] 否 (x)
7	
8	RJ1400106_E04_y# 169
9	RJ1400129_G03_ył 1.9
10	RJ1400131_G05_ył 169 🗙 284 🛛 284 165
11	RJ1400132_G06_yh 145