

**Набор реагентов для ДНК паспортизации сортов
винограда на основе мультиплексного ПЦР-анализа
9 микросателлитных локусов, содержащих STR-повторы**

Знак	Описание
	Производитель
	Каталожный номер
	Срок годности
	Номер лота
	Температурный режим хранения
	Минимальное количество реакций
	Ссылка на информацию, размещённую на сайте производителя

Набор «ГенЭксперт Виноград» поставляется в пробирках, объединённых по 8 штук в стрипы с отдельно прикреплёнными крышками и рассчитан на 48 реакций

ГенЭксперт Виноград

Кат №	Количество реакций
ГЭ-В-48	48

КОНТАКТНЫЕ ДАННЫЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Информацию о наших продуктах и услугах Вы можете найти на сайте **www.syntol.ru**

Телефон

+7 (495) 984-69-93 (многоканальный)

+7 (499) 977-74-55

+7 (495) 506-79-97

Электронная почта

syntol@syntol.ru

info@syntol.ru





«ГенЭксперт Виноград» — набор реагентов для ДНК паспортизации сортов винограда на основе мультиплексного ПЦР-анализа 9 микросателлитных локусов, содержащих короткие tandemные повторы (Short Tandem Repeat) или STR-локусов.

9 STR-локусов: VVS2, VVMD5, VRZAG62, VVMD32, VRZAG79, VVMD27, VVMD28, VVMD25, VMMD7 выбраны, исходя из показанной для них высокой информативности и рекомендованы союзом генетиков винограда как основные для генотипирования *Vitis vinifera*. В качестве референсного сорта использован сорт Pinot noir.

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 9 STR-локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов находится в диапазоне 135-298 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с детектированием сигнала флуоресценции, индуцированного лазером. В наборе используется шесть флуоресцентных красителей, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременного детектирования в разных каналах флуоресценции.

Праймеры содержат пять флуоресцентных красителей, детектируемых в каналах 6R110¹, 6R6G², 6TAMRA³, 6ROX⁴, 6Sy630⁵. Фрагменты стандарта длины СД-450 мечены пятым флуоресцентным красителем Sy660 и детектируются в канале LIZ одновременно с продуктами ПЦР.

^[1] С переносом энергии флуоресценции 5' 6Alexa-6R110 -праймер 3'

^[2] С переносом энергии флуоресценции 5' 6Alexa-6R6G-праймер 3'

^[3] С переносом энергии флуоресценции 5' 6Alexa-6TAMRA -праймер 3'

^[4] С переносом энергии флуоресценции 5' 6Alexa-6ROX -праймер 3'

^[5] С переносом энергии флуоресценции 5' 6Alexa-6Sy630 -праймер 3'

ОГЛАВЛЕНИЕ

Описание набора	3
1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ	5
1.1 Обоснование необходимости разработки и использования продукта	5
1.2. Компоненты набора и состав	7
1.3. Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование	8
1.4 Условия хранения	9
1.5 Основные характеристики набора	9
1.6 Гарантии качества	9
2. МЕТОДИКА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК	10
3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК	10
4. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ	10
4.1 Положительный контрольный образец	10
4.2 Аллельная лестница	10
5. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	11
5.1 Подготовка к проведению реакции амплификации	11
5.2 Условия амплификации	11
6. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА НА ПРИБОРЕ НАНОФОР 05	12
6.1 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	14
6.2 Запуск фрагментного анализа	15
7. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «GeneMarker»	16
7.1 Импорт файлов для анализа данных	16
7.2 Создание проекта анализа данных	17
7.3 Размерный стандарт СД-450	22
7.4 Анализ аллельной лестницы	23
7.5 Анализ положительного контрольного образца ПК0-ГЭ-В	24
7.6 Анализ отрицательного контрольного образца	27
7.7 Анализ сорта образца	27
8. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «ГенЭксперт Виноград»	30
8.1 Запуск анализа	30
8.2 Создание схемы анализа	32
8.3 Создание стандарта длины	36
8.4 Стандарт длины СД-450	37
8.5 Интерпретация результатов анализа	38
8.6 Формирование протокола исследования	45

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

1.1 ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ РАЗРАБОТКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТА

Виноград является одной из наиболее важных культур в сельскохозяйственном производстве. Высокая урожайность, пластичность и большое разнообразие направлений использования гроздей делает эту культуру широко распространенной во всем мире.

Разработка набора для генотипирования винограда является актуальной и перспективной задачей, которая может значительно повлиять на виноградарство и виноделие.

Основные аргументы в пользу её необходимости:

[1] Ускорение селекционного процесса. Генотипирование позволяет идентифицировать гены, ответственные за ключевые ценные признаки:

- устойчивость к болезням (милдью, оидиум, филлоксеру);
 - адаптацию к климатическим изменениям (засухоустойчивость, морозостойкость);
 - качество ягод (сахаристость, кислотность, содержание ароматических веществ);
- и сокращать сроки создания сортов.

[2] Контроль подлинности сортов и борьба с фальсификацией. Виноград и вино часто подвергаются фальсификации (подмена сортов, несоответствие происхождения). Генотипирование позволяет точно идентифицировать сорт и его происхождение, что важно для:

- сертификации посадочного материала (питомники);
- контроля качества вин (например, подтверждение сортового состава в винах PDO/PGI).

[3] Оптимизация виноградников и управление генетическим разнообразием.

Анализ генетического профиля помогает:

- подбирать оптимальные комбинации подвоев и привоев;
- избегать близкородственного скрещивания;
- сохранять редкие и аборигенные сорта.

[4] Экономическая выгода для виноградарства и виноделия.

- снижение потерь от болезней и неблагоприятных условий;
- повышение урожайности и качества продукции;
- увеличение экспортного потенциала за счёт гарантии подлинности сортов.

[5] Научные и биотехнологические перспективы

- исследование генов, связанных с устойчивостью и качеством, открывает путь к геномному редактированию (CRISPR);
- создание генетических баз данных для глобального мониторинга сортов винограда.

Таким образом разработка набора «ГенЭксперт Виноград» на генотипирование сортов винограда востребована в селекции, контроле качества, защите от фальсификации и оптимизации производства. Это инвестиция в будущее виноградарства, особенно в условиях изменения климата и роста конкуренции на рынке вина.

Для получения полного (по всем 9-ти локусам) генотипа образца достаточно 2 нанограмма (нг) не деградированной ДНК. Оптимальное количество ДНК в реакцию – 5 нг.

Реакционные смеси в наборе находятся в пробирках объемом 0.2 мл, объединенных в стрипы из восьми микропробирок 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 15 мкл специального раствора (раствор активатора) в каждую пробирку. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 5 мкл. Благодаря высокой устойчивости реакционной смеси к действию ингибиторов, большой объем препарата ДНК не мешает успешной амплификации.

Набор «ГенЭксперт Виноград» может использоваться для создания баз данных с ДНК паспортами сортов винограда.

Программное обеспечение «ГенЭксперт Виноград», позволяет проводить анализ полученных данных и автоматическое определение сорта винограда, путем сравнения с ДНК паспортами сортов из базы данных. Создана и постоянно расширяется база данных ДНК паспортов сортов виноградов, производимых на территории Российской Федерации, как отечественных, так и иностранных оригинаторов. База насчитывает ДНК паспорта более 95 сортов винограда.

Ниже приводятся примеры программ, подобранных для приборов:
АНК 32/48, GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720,
CFX BioRad, T100 BioRad,
ДТ-классик, DT-prime 4M1, DT-prime II 5M1 ДНК-Технология,
Gentier 96E ООО Синтол,
MiniAmp Plus Applied Biosystems, QuantStudio 5 Applied Biosystems,
Bioer, GeneExplorer V GE-96S Biohit.

Анализ ПЦР продуктов проводится с использованием генетического анализатора **Нанофор 05** (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) или ABI Prism 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

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

Таблица 1. Описание STR-локусов набора «ГенЭксперт Виноград»

№	Локус	Краситель	Длина	Повтор	Хромосома
1	VVS2	6R110	127-178	(GA) _n	XI
2	VVMD5	6R110	222-274	(CT) ₃ 3AT(CT) ₁₁ ATAG(AT) ₃	XVI
3	VRZAG62	6R6G	173-229	(CT) _n	VII
4	VVMD32	6R6G	240-300	(CT) _n	IV
5	VRZAG79	6TMR	233-278	(CT) _n	V
6	VVMD27	6ROX	169-220	(TC) _n	V
7	VVMD28	6ROX	226-291	(CT) _n	III
8	VVMD25	6Sy630	150-190	(CT) _n	XI
9	VMMD7	6Sy630	235-277	(GA) _n	VII

Компонент набора	Количество
Реакционная смесь РС-ГЭ-В-48, пробирки 0.2 мл	6 стрипов по 8 микропробирок
Раствор активатора РА-ГЭ-В, 0.8 мл.	2 пробирки
Положительный контрольный образец ПКО-ГЭ-В, 20 реакций	1 пробирка
Аллельная лестница АЛЛ-ГЭ-В, 20 нанесений	1 пробирка
Стандарт длины СД-450, 120 мкл	1 пробирка
Спектральный калибратор 6а-СК-6, 120 нанесений	1 пробирка
Деионизированная вода, dd H ₂ O, 1.7 мл	2 пробирки
Бины и панели для программы «ГенЭксперт Виноград» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург). Панель для программы «GeneMarker»	

Реакционная смесь в стрипованных микропробирках представляет собой реакционные пробирки объемом 0,2 мл, объединенные в стрипы по 8 шт, которые предназначены для проведения в них полимеразной цепной реакции.

На дне пробирок содержатся все необходимые компоненты ПЦР включая Taq-полимеразу, смесь дНТФ, реакционный буфер, смесь праймеров в сухом виде.

Благодаря флуоресцентно-меченым праймерам, сухая реакционная смесь на дне пробирок имеет розовый цвет. Раствор активатора используется для разведения лиофилизированной реакционной смеси. Содержит буферный раствор и ионы магния Mg²⁺ в качестве активатора ПЦР.

Деионизированная 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.о.): 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 **СД-450** используется на этапе капиллярного электрофореза, вносится в каждый исследуемый образец по 1 мкл и позволяет определять длину 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.

1.3. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР И ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Реагент	Производитель	Каталожный номер
Набор «СОРБ-ГМО-Б» (ЦТАБ + сорбент) для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов	ООО «СИНТОЛ»	GM-503-50
Буфер для проведения капиллярного электрофореза (ТАПС)	ООО «СИНТОЛ»	БТС-0025
Полимер для проведения капиллярного электрофореза (ПДМА-6)	ООО «СИНТОЛ»	ПД-0607
Полимер для проведения капиллярного электрофореза (ПДМА-4)	ООО «СИНТОЛ»	ПД-0407
Деионизованный формамид	ООО «СИНТОЛ»	ДИ-ФА
Набор реагентов для измерения концентрации ДНК «СинКвант HS ДНК»	ООО «СИНТОЛ»	E-023-1250

Оборудование	Производитель
Флуориметр «Qubix»	Айвок х «СИНТОЛ»
Гомогенизатор (Precellys Evolution/аналог)	
Высокоскоростная центрифуга (Eppendorf 5424/аналог)	
Центрифуга охлаждаемая, с ротором для 96-луночных планшетов (Eppendorf 5810 R/аналог)	
Вакуумный испаритель с ротором для 96-луночных планшетов (Eppendorf Concentrator plus/аналог)	
Амплификатор для 96-луночных планшетов ДТ Классик	ООО «ДНК-Технология»
Микроцентрифуга-встряхиватель «Циклотемп-901»	Циклотемп
Микроцентрифуга для стрипованных пробирок «Циклотемп-903»	Циклотемп
Термостат твердотельный с нагреваемой крышкой «Циклотемп-303»	Циклотемп
Пипетка переменного объема 0,1-2,5 мкл	
Пипетка переменного объема 0,5-10 мкл	
Пипетка переменного объема 2-20 мкл	
Пипетка переменного объема 10-100 мкл	
Пипетка переменного объема 20-200 мкл	
Пипетка переменного объема 100-1000 мкл	
Пипетка 8-ми канальная переменного объема 0,5-10 мкл	ООО «ДНК-Технология»
Штатив «рабочее место» 96×1,5/2 мл «PM-96X1,5/2,0 МЛ»	ООО «СИНТОЛ»
Штатив «рабочее место» 48×2×0,2мл «PM-2X48X0,2»	ООО «СИНТОЛ»
Штатив для переноса пробирок 96×0,2 мл «ПЦР-96»	ООО «СИНТОЛ»
Штатив магнитный для выделения ДНК «М-24»	ООО «СИНТОЛ»
Отсасыватель медицинский «ОМ-1»	Утёс
Камера для горизонтального электрофореза «SE-1/SE-2»	Хеликон
Источник питания «Эльф-4»	ООО «ДНК-Технология»
Трансillюминатор «КвантМ-312Б», 20 x 20 см	Хеликон
Система гель-документирования «Взгляд»	Хеликон

1.4 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

При транспортировке компонентов требуется соблюдение температурного режима 2...8 °С

Сухие реакционные смеси и аллельная лестница чувствительны к воздействию света и должны храниться в темном месте.

Стандарт длины **СД-450** и Спектральный калибратор **6а-СК-6** транспортируются при –20 °С.

Сразу после получения набор рекомендуется хранить в темноте при температуре 2...8 °С.

Спектральный калибратор **6а-СК-6** и размерный стандарт **СД-450** хранить при температуре –20 °С.

После разведения сухих компонентов Положительный контрольный образец, **ПКО-ГЭ-В** и Аллельная лестница, **АЛЛ-ГЭ-В**, рекомендуется хранить в темноте при температуре –20 °С.

1.5 ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Количество одновременно анализируемых маркеров – 9.

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 6.

Оптимальное количество вносимой ДНК – 5 нг.

1.6 ГАРАНТИИ КАЧЕСТВА

Качество каждого компонента набора проверено и контролируется в процессе производства. Каждый выпущенный лот лиофилизированных реагентов регулярно проверяется на соответствие заявленным характеристикам в течение 6 месяцев. В случае возникновения вопросов относительно качества набора «ГенЭксперт Виноград» просим незамедлительно связаться с компанией «Синтол».

2. МЕТОДИКА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

Для анализа рекомендуется брать по 3 индивидуальных образца (лист, шкурка ягоды, ветка, пробирочное растение, привой). Во избежание ложного ответа при анализе (смесевой образец), необходимо производить точечный отбор образцов. Точечной пробой служит листовая пластина растения (одна проба — один лист). Лист растения срезают острым ножом или ножницами, упаковывают в чистую тару (полиэтиленовый или бумажный пакет, целлофан, и т. д.), снабжают этикеткой с указанием шифра пробы, номера партии, хозяйство, дата и места отбора для последующего выделения ДНК. Для выделения ДНК рекомендуется использовать набор «Сорб-ГМО-Б» (ЦТАБ + сорбент) — набор реагентов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов («НПФ Синтол», кат№ GM-503-50).

3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК

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, биolumинесцентным обнаружением) методами, либо путем количественной ПЦР. Определить концентрацию ДНК и степень ее чистоты, можно с помощью спектрофотометра. Для оценки чистоты препарата ДНК проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 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 A260/235 должно быть больше **2,2**.

4. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ

4.1 ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ

Сразу после получения набора, пробирку с ПКО-ГЭ-В 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-ГЭ-В 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).

4.2 АЛЛЕЛЬНАЯ ЛЕСТНИЦА

Сразу после получения набора, пробирку с аллельной лестницей АЛЛ-ГЭ-В 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 АЛЛ-ГЭ-В 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.

5. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

5.1 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

Достать пробирки ПКО-ГЭ-В, раствор активатора РА-ГЭ-В и исследуемые образцы, а также стрипы с лиофилизированной реакционной смесью РС-ГЭ-В-48. Выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на вортексе жидкие растворы и центрифугировать в течение нескольких секунд для сброса капель. В каждую пробирку сухого набора внести:

Компоненты набора	Объем на 1 образец, мкл
Сухая реакционная смесь РС-ГЭ-В-48	
Раствор активатора РА-ГЭ-В	15
Геномная ДНК (2-10 нг) или ПКО-ГЭ-В	1-5
Деионизированная вода ddH ₂ O	до 25

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

Внести в подготовленные микропробирки стрипов по 1-5 мкл исследуемых образцов, используя накопечники с аэрозольным барьером. После внесения всех компонентов, реакционную смесь необходимо тщательно перемешать, используя вортекс.

Примечание: используются образцы ДНК с концентрацией 2-10 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 (pH >7), содержащих небольшое количество ЭДТА (например, ТЕ 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 ПКО-ГЭ-В), один отрицательный контроль (деионизированная вода ddH₂O).

5.2 УСЛОВИЯ АМПЛИФИКАЦИИ

Приведенные ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных параметров.

Ниже приводятся примеры программ, подобранных для приборов АНК 32/48, GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, CFX BioRad, T100 BioRad, ДТ Классик, DT-prime 4M1, DT-prime II 5M1 ДНК-Технология, Gentier 96E ООО Синтол, MiniAmp Plus Applied Biosystems, QuantStudio 5 Applied Biosystems, Bioer, GeneExplorer V GE-96S Biohit.

Температура	Время	Циклы
95 °C	3 мин	1
95 °C	10 сек	35
59 °C	40 сек	
72 °C	20 сек	
68 °C	10 мин	1
4 °C	10 мин	1

Продукты ПЦР можно хранить неделю при 2...8 °C в защищенном от света месте. В случае, если амплифицированные продукты необходимо хранить более недели, рекомендуется заморозка при -20 °C.

6. 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 Виноград»**.

Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 6-ти цветным калибратором **6а-СК-6** (ООО «Синтол»), который входит в состав набора.

Спектральный калибратор содержит смесь из 6 фрагментов ДНК разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями (6Alexa-6R110, 6Alexa-6R6G, 6Alexa-6TAMRA, 6Alexa-6ROX, 6Alexa-6Sy630, 6Alexa-Sy660). Эти красители использованы в наборе ГенЭксперт-Виноград (FAM, R6G, TAMRA, ROX, Sy630) и в размерном стандарте СД-450 (Sy660).

1. В отдельной пробирке смешать 80 мкл **Ди-формамида** (ООО «Синтол», кат. № ДИ-ФА) и 10 мкл раствора **6а-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. Денатурация не требуется.
3. Установить 96-луночный планшет или стрипованные микропробирки в прибор для капиллярного электрофореза.
4. Провести калибровку по стандартному протоколу спектральной калибровки.

Краситель	Цвет	Порядковый номер пика
6Alexa-6R110	Синий	6
6Alexa-6R6G	Зеленый	5
6Alexa-6TAMRA	Черный	4
6Alexa-6ROX	Красный	3
6Alexa-6Sy630	Пурпурный	2
6Alexa-Sy650 (с.д.)	Оранжевый	1

Рекомендуемые параметры программы спектральной калибровки зависят от длины капилляров и типа полимера:

Параметры	36 см		50 см	
	ПДМА-4	ПДМА-6	ПДМА-4	ПДМА-6
Температура первого термостата [°C]	60	60	60	60
Температура второго термостата [°C]	60	60	60	60
Напряжение префореза [В]	15000	15000	15000	15000
Время префореза [сек]	180	180	180	180
Напряжение ввода пробы [В]	3000	3000	3000	3000
Время ввода пробы [сек]	10	10	10	10
Напряжение электрофореза [В]	12200	12200	12200	12200
Время электрофореза [сек]	1025	1420	1850	2400
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	675	830	1200	1500
Длит. шага высокого при фореze [сек]	15	15	15	15
Напр. шага высокого при фореze [В]	1000	1000	1000	1000
Скорость шприца при подготовке к префорезу [Шаг/сек]	4	4	4	4
Число шагов шприца при подг. к префорезу	800	800	1200	1200
Число шагов после фореze	20	20	20	20
=0 не включать термостат. =1 включать термостат	1	1	1	1
=0 не включать 2-й термостат. =1 включать 2-й термостат	1	1	1	1

ПРИМЕЧАНИЕ! Параметры инъекции можно редактировать по результатам калибровки, например, увеличить время ввода пробы при слабом сигнале.

При работе с генетическим анализатором **Нанофор 05** и последующем анализе данных в программе **«ГенЭксперт Виноград»** необходимо следовать **Руководству пользователя Нанофор 05**.

6.1 ПОДГОТОВКА И ЗАГРУЗКА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

1. ПЦР продукты используются без разведения. В зависимости от эффективности прохождения реакции в образцах из разного исходного материала сигналы во время электрофореза могут отличаться. При необходимости 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-формамид	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 **АЛЛ-ГЭ-В**.

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 ПЦР-продукта.
6. В отдельную лунку внести 1 мкл раствора аллельной лестницы АЛЛ-ГЭ-В.
7. Закрыть микропробирки 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.

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

6.2 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:

Параметры	36 см		50 см	
	ПДМА-4	ПДМА-6	ПДМА-4	ПДМА-6
Температура первого термостата [°C]	60	60	60	60
Температура второго термостата [°C]	60	60	60	60
Напряжение префореза [В]	15000	15000	15000	15000
Время префореза [сек]	180	180	180	180
Напряжение ввода пробы [В]	1800	1800	2400	2400
Время ввода пробы [сек]	5	5	5	5
Напряжение электрофореза [В]	12200	12200	12200	12200
Время электрофореза [сек]	1600	2200	2500	3750
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	580	750	1000	1300
Длит. шага высокого при фореze [сек]	15	15	15	15
Напр. шага высокого при фореze [В]	1000	1000	1000	1000
Скорость шприца при подготовке к префорезу [Шаг/сек]	4	4	4	4
Число шагов шприца при подг. к префорезу	800	800	1200	1200
Число шагов после фореze	20	20	20	20
=0 не включать термостат. =1 включать термостат	1	1	1	1
=0 не включать 2-й термостат. =1 включать 2-й термостат	1	1	1	1

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

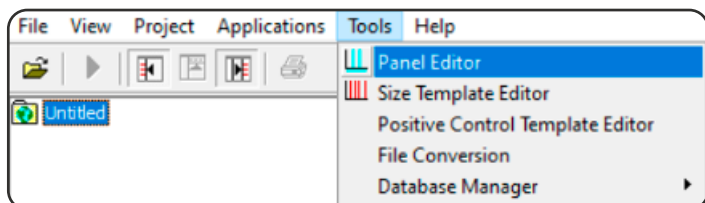
7. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «GeneMarker»

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

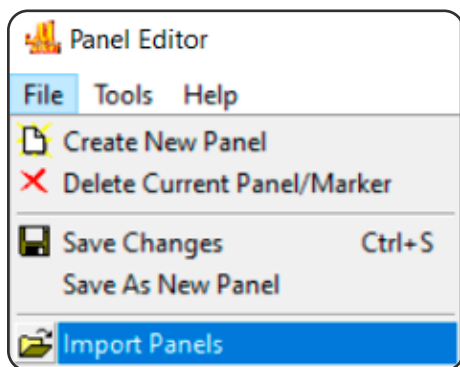
7.1 ИМПОРТ ФАЙЛОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ

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

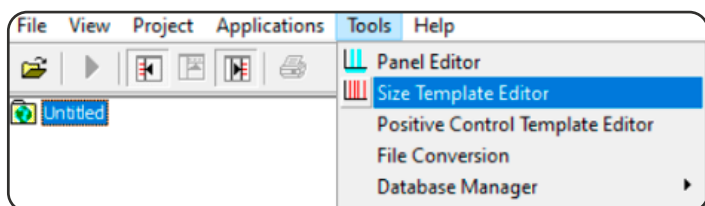
1. Запустить «GeneMarker». В верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor»



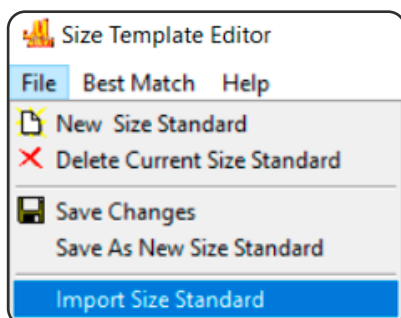
2. В открывшемся окне выбрать «File» в выпавшем списке «Import Panels»



3. Выбрать папку с файлом панели «GenExpert-Vitis» 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»



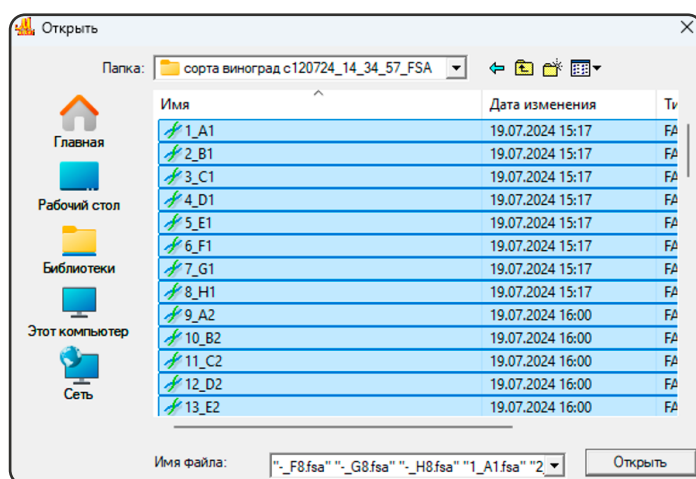
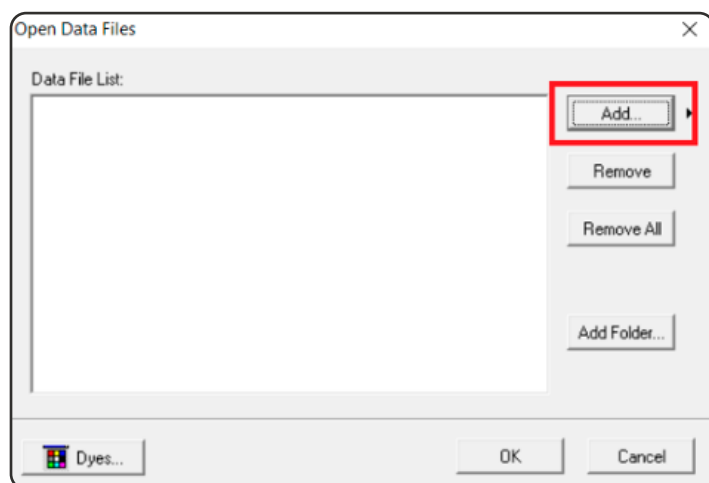
7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта SD450 и подгрузить его в программу «GeneMarker»
8. Закрыть окно «Size Template Editor»

7.2 СОЗДАНИЕ ПРОЕКТА АНАЛИЗА ДАННЫХ

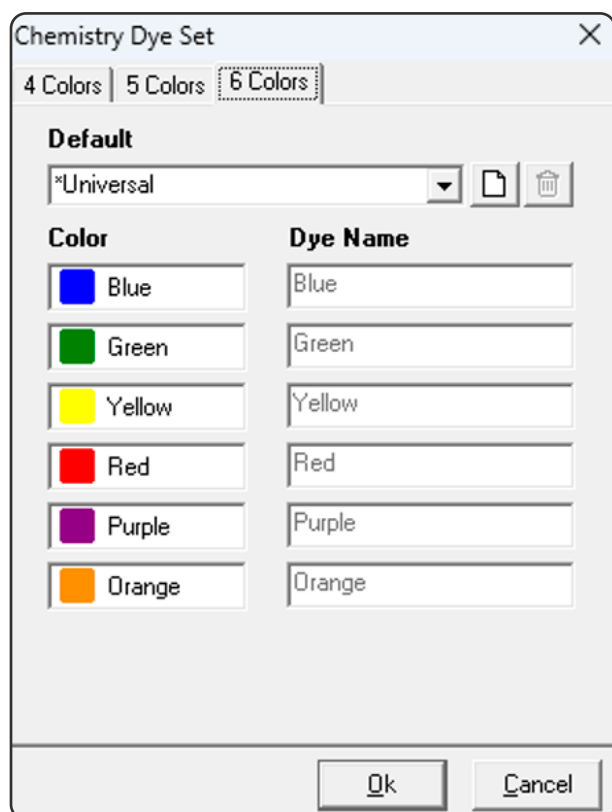
1. Запустить программу «GeneMarker». Кликнуть по «Open Data» в окне «Start your project».



2. Нажать «Add» и загрузить нужные файлы.

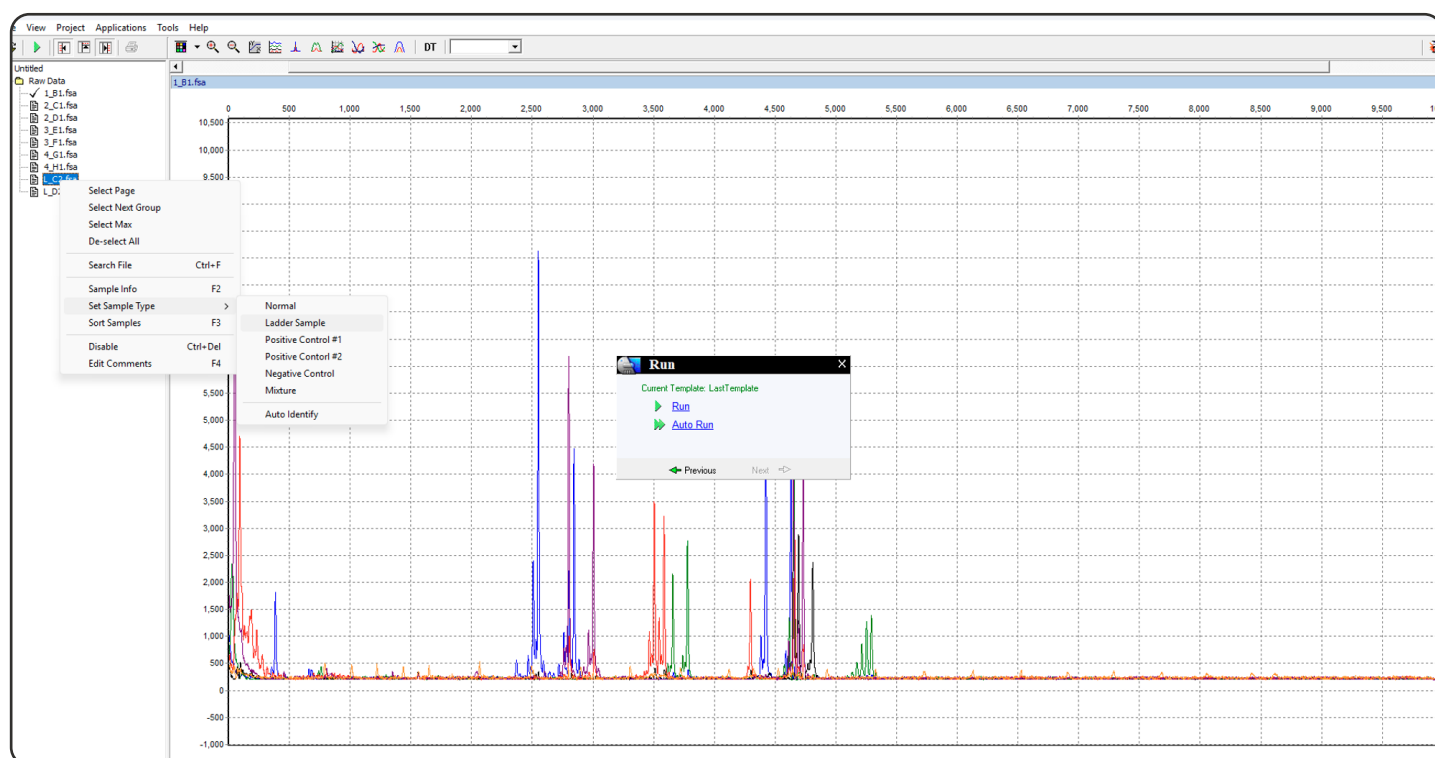


3. Нажать в левом нижнем углу «Dyes» и выбрать 6 каналов и «OK».

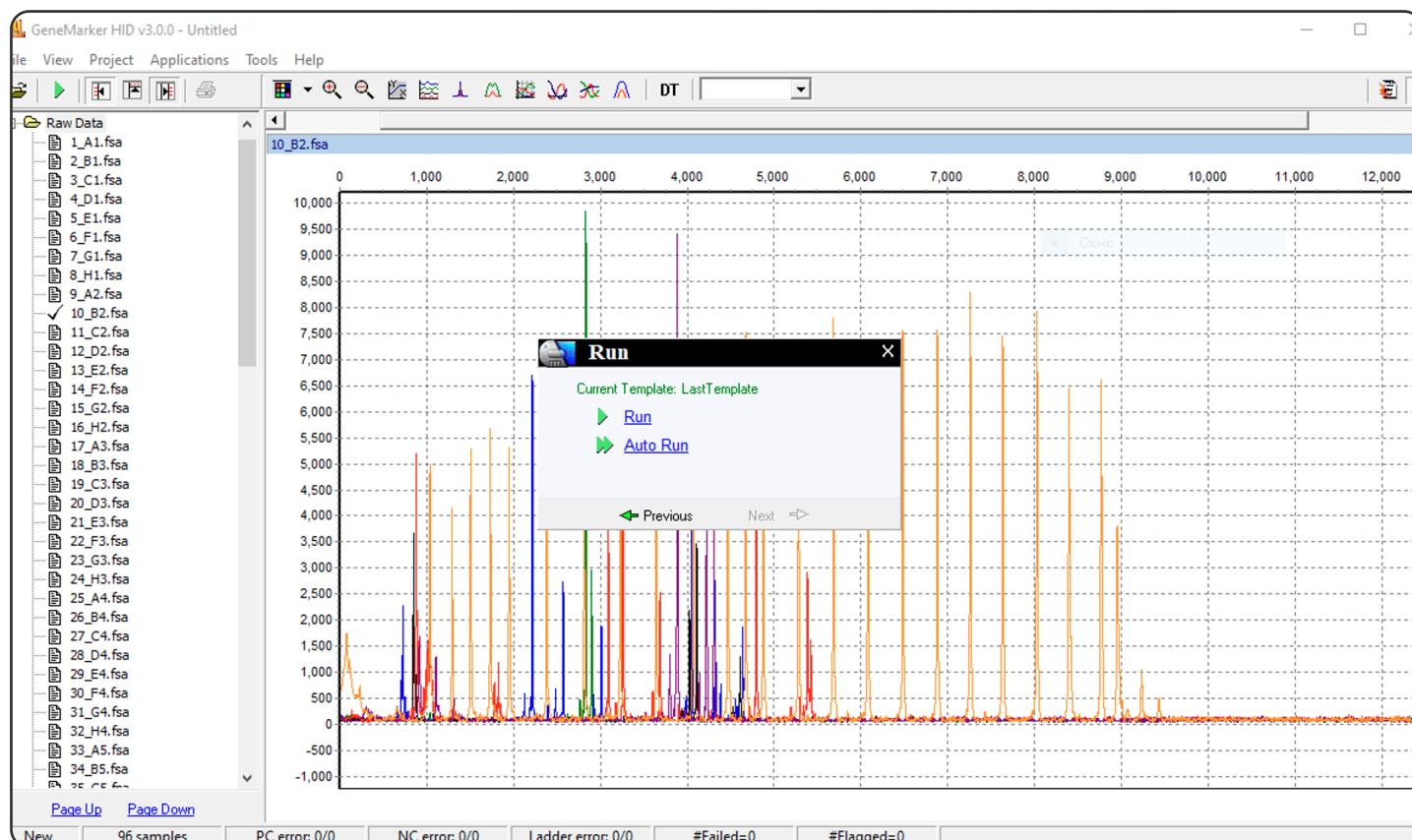


4. После добавления файлов нажать «OK».

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».



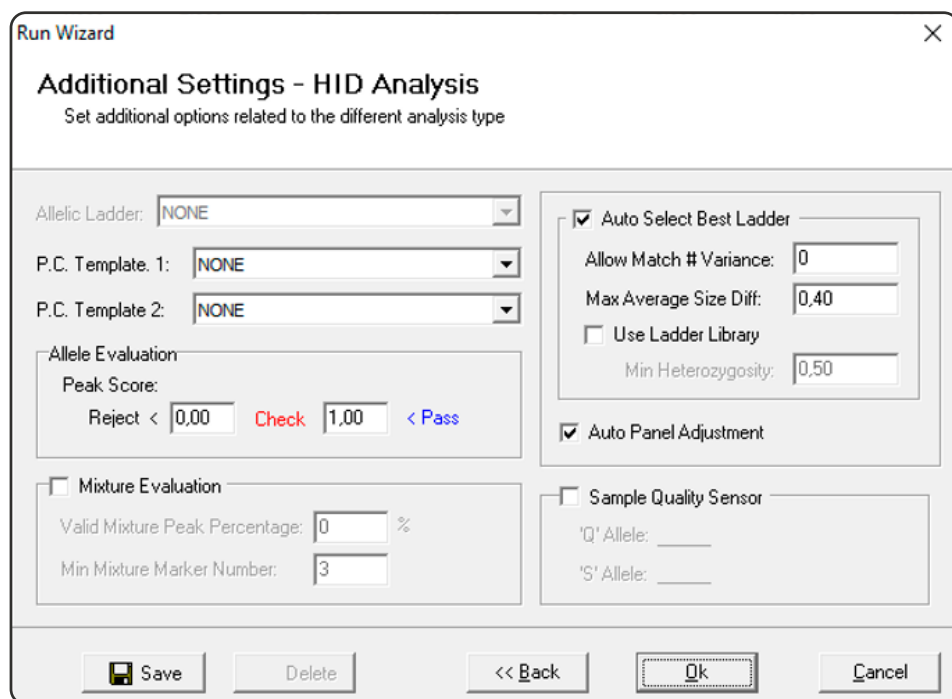
7. В открывшемся окне «Run Wizard» выбрать «Select an existing template or create one» и в «Template Name» внести имя метода «GenExpert-Vitis», в графе «Panel» выбрать панель «GenExpert-Vitis», в графе «Size Standard» выбрать размерный стандарт «SD450», выбрать цвет в «Standard Color» – «Orange», нажать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

The screenshot shows the 'Run Wizard' dialog box with the 'Template Selection' tab active. The subtitle is 'Set the template of the project'. There are two radio buttons: 'Select an existing template or create one' (selected) and 'Use last template'. On the left, a list of templates is shown with checkboxes: GlobalFile, Identifier, Minifiler, PowerPlexFusion_6C, PowerPlexY23, PowerPlex_16, PowerPlex_18D, PowerPlex_21, and PowerPlex_FST_17. On the right, there are four input fields: 'Template Name' with the text 'VITIS', 'Panel' with a dropdown menu showing 'GE_VITIS_10', 'Size Standard' with a dropdown menu showing '450-320', and 'Standard Color' with a dropdown menu showing 'Orange'. At the bottom, there are five buttons: 'Save' (with a floppy disk icon), 'Delete' (with a red X icon), '<< Back', 'Next >>', and 'Cancel'.

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

The screenshot shows the 'Run Wizard' dialog box with the 'Data Process - HID Analysis' tab active. The subtitle is 'Set data process options'. There are two main sections: 'Raw Data Analysis' and 'Allele Call'. In the 'Raw Data Analysis' section, there are checkboxes for 'Auto Range (frame)' (checked), 'Smooth' (checked), 'Enhanced Smooth' (unchecked), 'Baseline Subtraction' (with options 'Superior' checked, 'Classic' unchecked, 'Enhanced' unchecked), 'Pull-up Correction' (checked), 'Spike Removal' (checked), 'Saturation Detection' (checked), and 'Saturation Repair' (checked). There are also input fields for 'Start' (0) and 'End' (10000). In the 'Allele Call' section, there are checkboxes for 'Auto Range (bps)' (unchecked), 'Peak Detection Threshold' (with a question mark icon), 'Dye Specific' (unchecked), 'Min Intensity' (50), 'Percentage >' (20), and 'Global Max'. There are also input fields for 'Start' (50) and 'End' (610), and a 'Max Intensity' field (32500). A note at the bottom of the 'Allele Call' section reads: 'Note: Use Panel Editor to set Min Intensity and % Global Max for peaks within Markers'. At the bottom of the dialog, there are five buttons: 'Save' (with a floppy disk icon), 'Delete', '<< Back', 'Next >>', and 'Cancel'.

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



Run Wizard X

Additional Settings - HID Analysis
Set additional options related to the different analysis type

Allelic Ladder: **NONE**

P.C. Template 1: **NONE**

P.C. Template 2: **NONE**

Allele Evaluation
Peak Score:
Reject < **0,00** **Check** **1,00** < **Pass**

☐ **Mixture Evaluation**
Valid Mixture Peak Percentage: **0** %
Min Mixture Marker Number: **3**

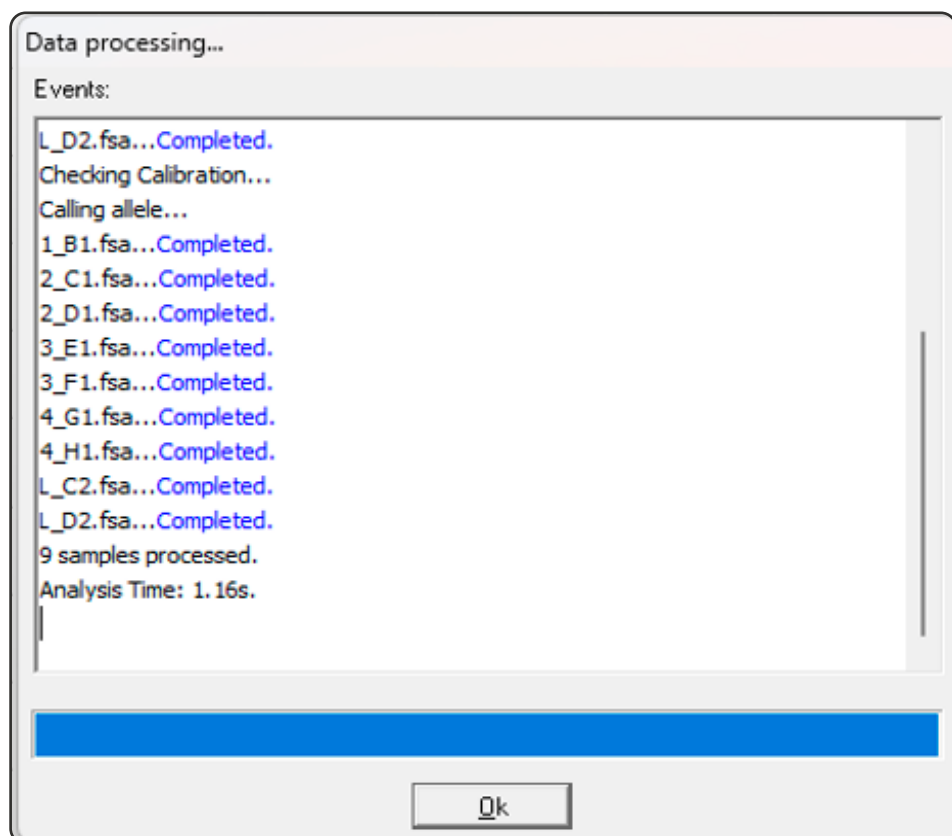
☒ **Auto Select Best Ladder**
Allow Match # Variance: **0**
Max Average Size Diff: **0,40**
☐ Use Ladder Library
Min Heterozygosity: **0,50**

☒ **Auto Panel Adjustment**

☐ **Sample Quality Sensor**
'Q' Allele: _____
'S' Allele: _____

Save **Delete** **<< Back** **Ok** **Cancel**

10. Идет анализ.



Data processing...

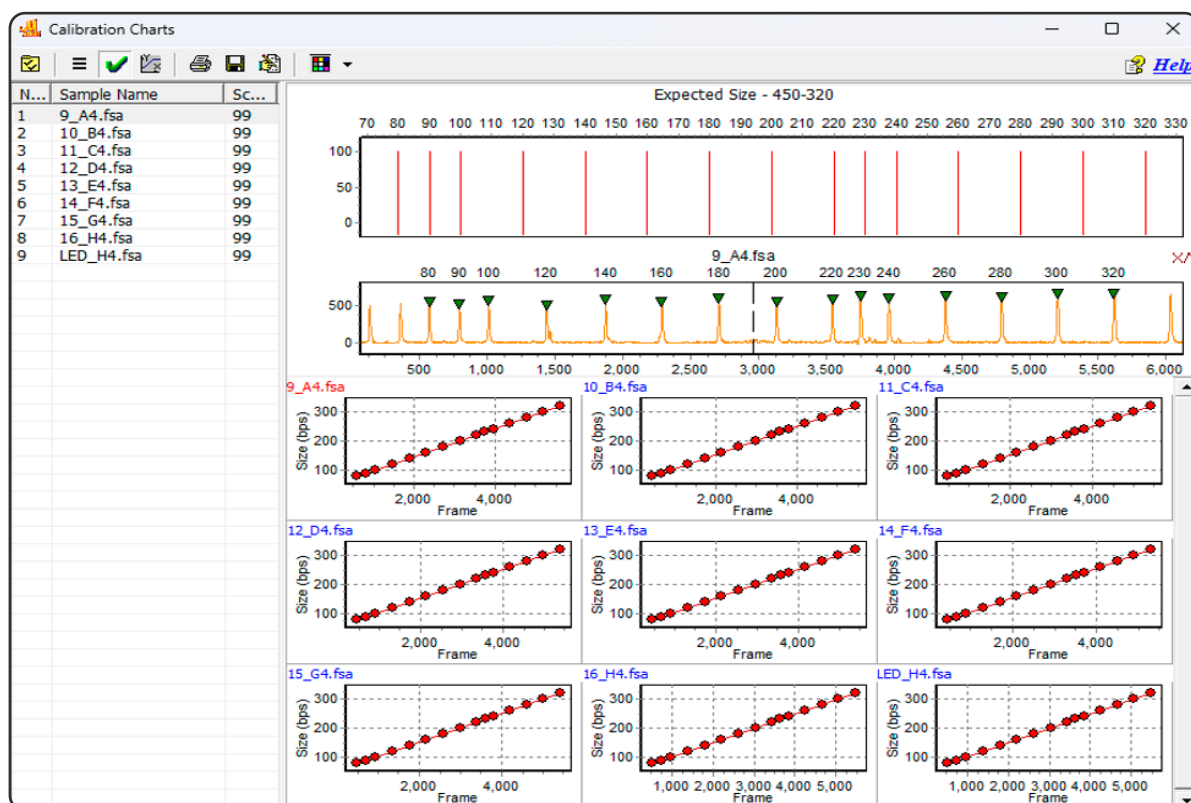
Events:

L_D2.fsa...Completed.
Checking Calibration...
Calling allele...
1_B1.fsa...Completed.
2_C1.fsa...Completed.
2_D1.fsa...Completed.
3_E1.fsa...Completed.
3_F1.fsa...Completed.
4_G1.fsa...Completed.
4_H1.fsa...Completed.
L_C2.fsa...Completed.
L_D2.fsa...Completed.
9 samples processed.
Analysis Time: 1.16s.

Ok



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

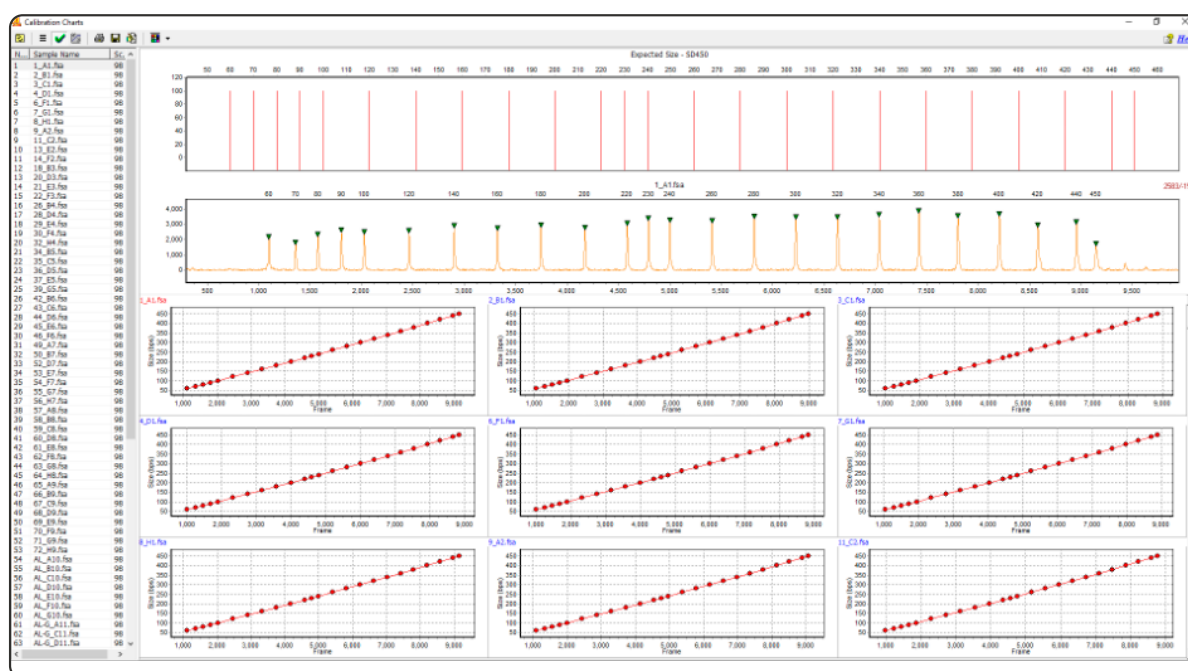


12. В окне «Browse by All Color» проверить расстановку **Аллельной лестницы**.



7.3 РАЗМЕРНЫЙ СТАНДАРТ СД-450

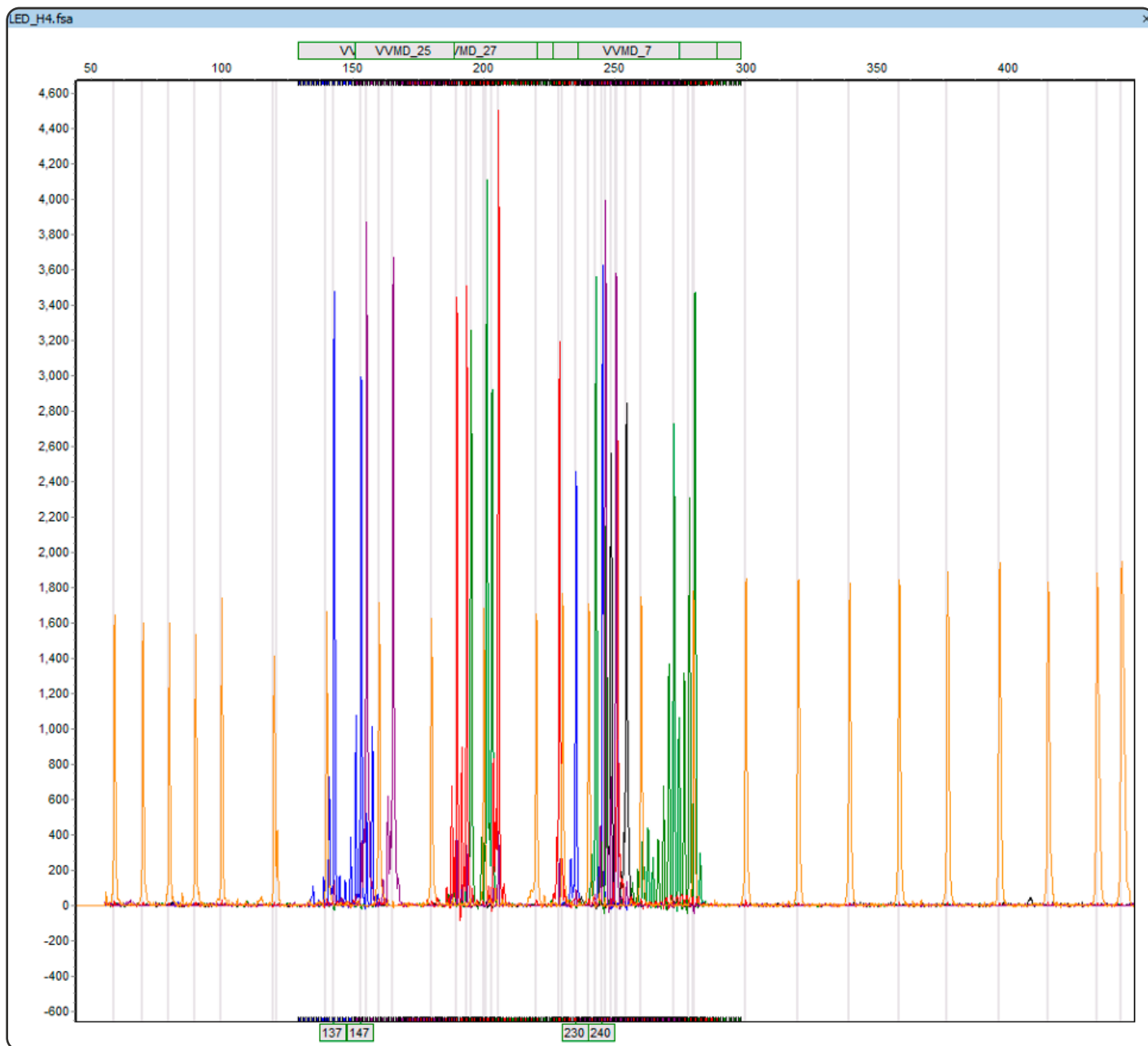
Ниже приводится пример электрофоретического разделения 24 фрагментов стандарта длины **СД-450** в канале детекции SY660 (5-ый из 6-ти каналов детекции). Размеры фрагментов: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450.



7.4 АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОЙ ЛЕСТНИЦЫ

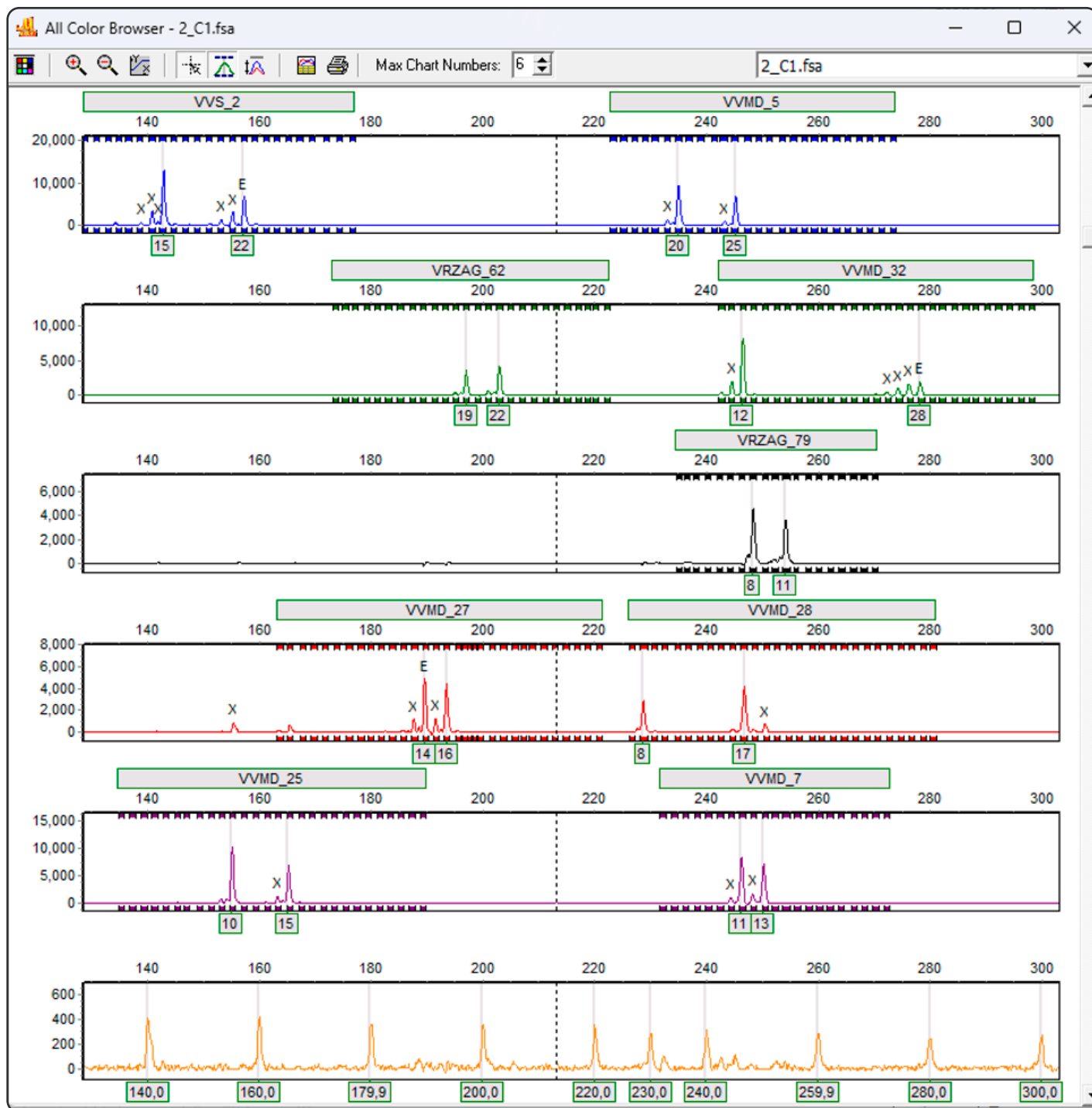
Ниже приводится расстановка электрофоретически разделенных фрагментов **Аллельной лестницы** по 5 каналам детекции.

ЛОКУС	АЛЛЕЛЬ	ПН
VVS_2_FAM	15	137
VVS_2_FAM	20	147
VVMD_5_FAM	20	230
VVMD_5_FAM	25	240
VRZAG_62_R6G	18	186
VRZAG_62_R6G	21	192
VRZAG_62_R6G	22	194
VVMD_32_R6G	10	236
VVMD_32_R6G	12	240
VVMD_32_R6G	25	266
VVMD_32_R6G	29	274
VRZAG_79_Tamra	8	239
VRZAG_79_Tamra	11	245
VVMD_27_ROX	14	186
VVMD_27_ROX	16	190
VVMD_27_ROX	22	202
VVMD_28_ROX	8	218
VVMD_28_ROX	19	240
VVMD_25_Sy630	10	239
VVMD_25_Sy630	15	249
VVMD_7_Sy630	11	239
VVMD_7_Sy630	13	243



7.5 АНАЛИЗ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА ПК0-ГЭ-В

1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу с ПК0.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал используя клавишу «**Show Dye**».
3. Убедиться, что всем пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля.



Аллельное состояние положительного контрольного образца ПК-ГЭ-В.

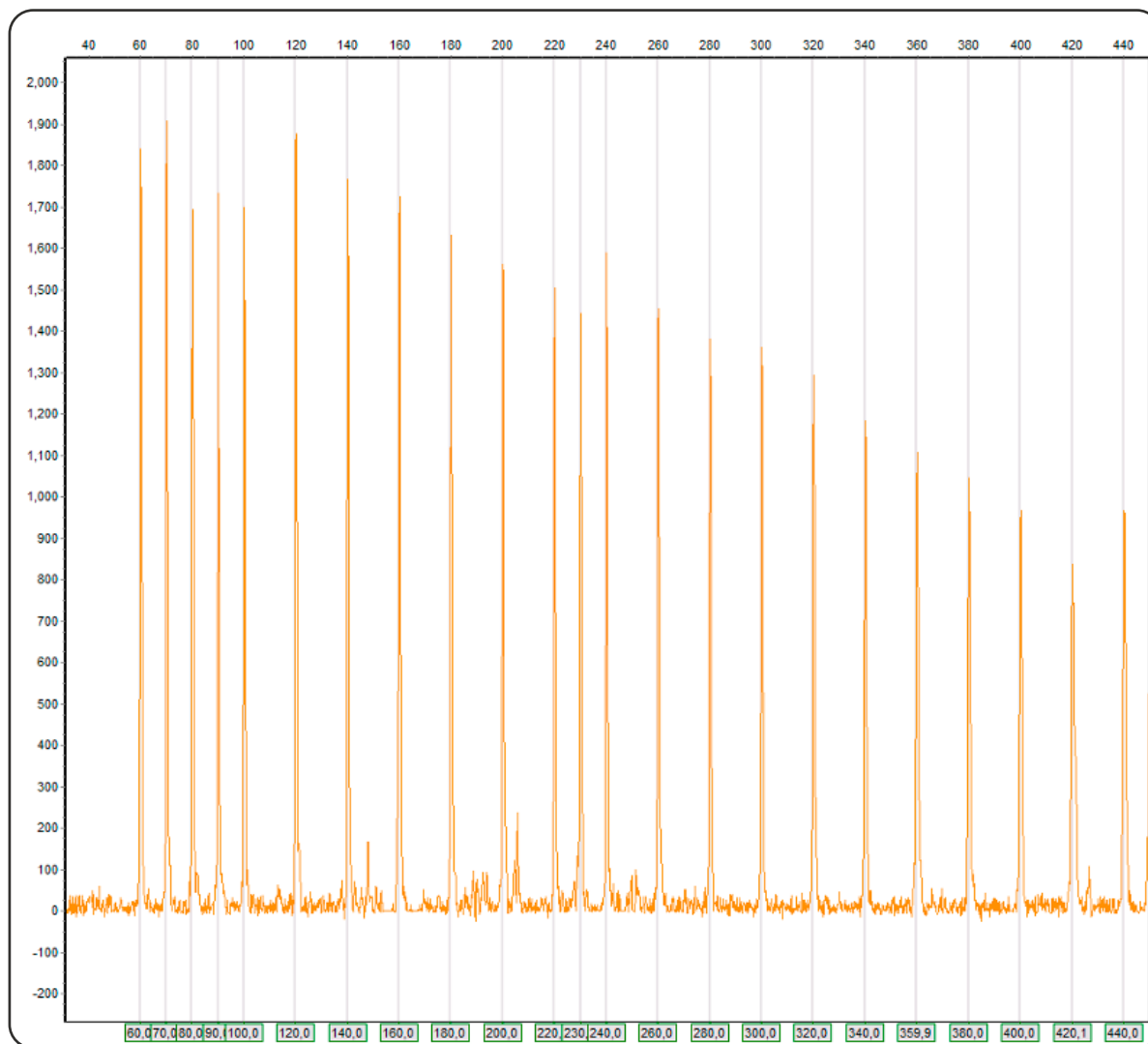


ПКО-ГЭ-В		
локус	аллель	пн
VVS2	15	137
	22	151
VVMD5	20	230
	25	240
VRZAG62	19	188
	22	194
VVMD32	12	240
	28	272
VRZAG79	8	239
	11	245
VVMD27	14	186
	16	190
VVMD28	8	218
	17	236
VVMD25	10	239
	15	249
VVMD7	11	239
	13	243

Аллельное состояние в пн положительного контрольного образца **ПКО-ГЭ-В** для анализа сорта по базе сортов.

7.6 АНАЛИЗ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА

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.



7.7 АНАЛИЗ СОРТА ОБРАЗЦА

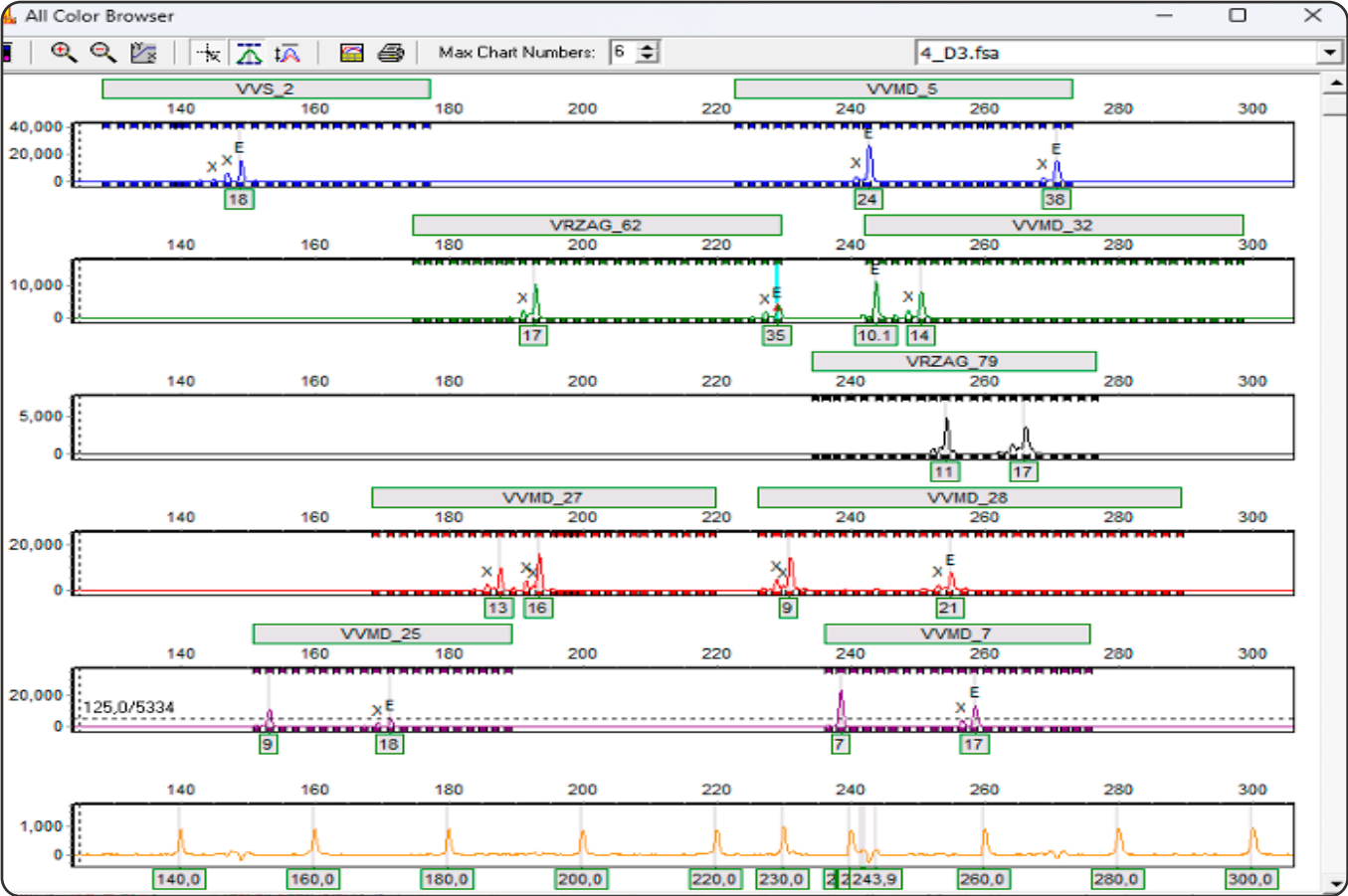
1. Кликнуть два раза левой клавишей мыши по файлу образца.
2. В верхнем меню выбрать анализируемый канал используя клавишу **«Show Dye»**.
3. Убедиться, что всем пикам по анализируемому каналу присвоено значение аллеля.



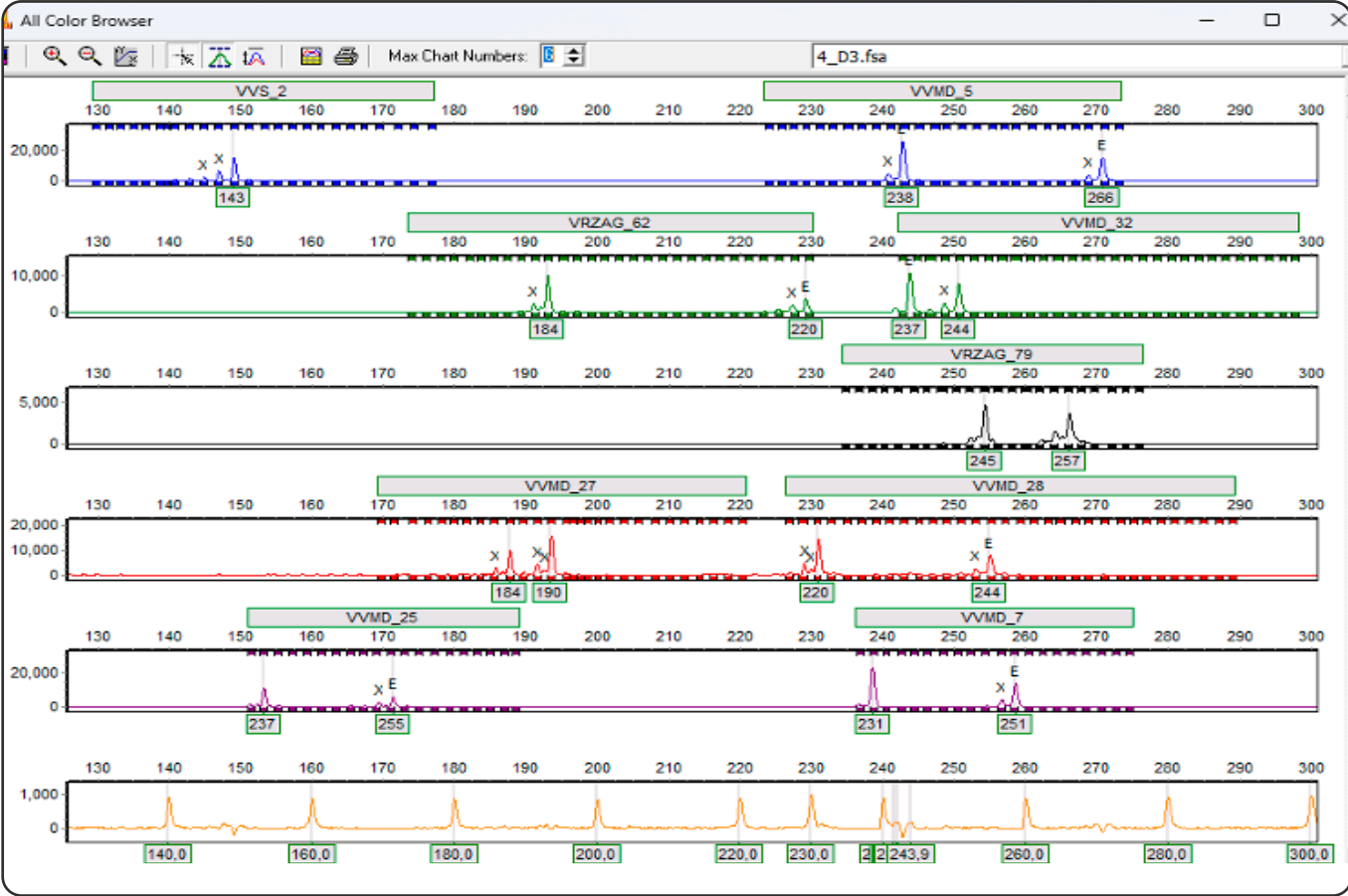
Махбор-Цибил	VVS2		VVMD5		VRZAG62		VVMD32		VRZAG79		VVMD27		VVMD28		VVMD25		VVMD7	
АЛЛЕЛЬ	13	13	20	24	18	23	24	28	14	16	11	18,1	22	33	11	15	8	16
ПН	133	133	230	238	186	196	264	272	251	255	180	195	246	268	241	249	233	249



COPT «FERCAL»



Fercal	WS2		VMD5		VRZAG62		VMD32		VRZAG79		VMD27		VMD28		VMD25		VMD7	
АЛЛЕЛЬ	143	143	238	266	184	220	237	244	245	257	184	190	220	244	237	255	231	251
ПН	18	18	24	38	17	35	10.1	14	11	17	13	16	9	21	9	18	7	17

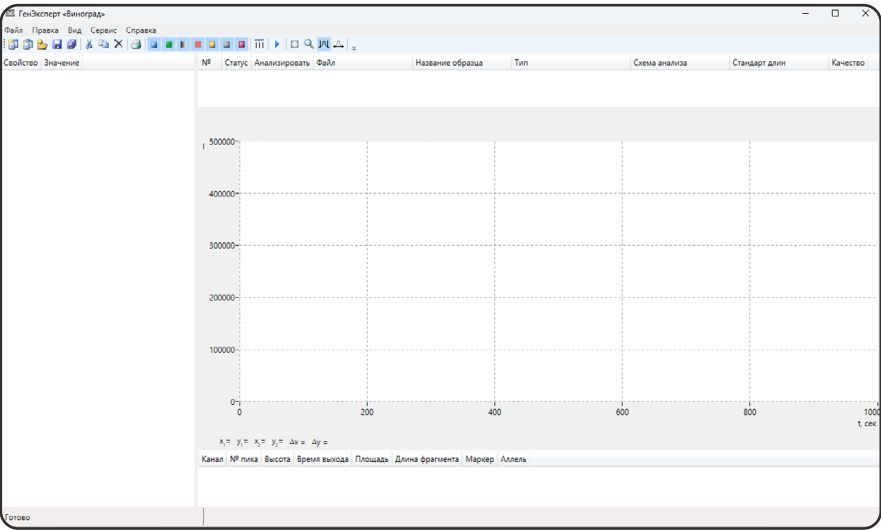


8. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «ГенЭксперт Виноград»

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

8.1 ЗАПУСК АНАЛИЗА

Запустить программу «ГенЭксперт «Виноград». Откроется **Основное окно** программы.



Образцы для анализа могут быть добавлены двумя способами:

Файл проекта. Файл проекта сохраняется в папке: D:\НАНОФОР 05\Data\год, месяц, число\название плашки час минута секунда начала анализа и имеет расширение .far. В меню **Файл** выбрать пункт **Открыть проект** (или нажать кнопку [1]). В открывшемся окне выбрать нужный файл и нажать **Открыть**. При этом будут открыты данные по всем образцам данного проекта.

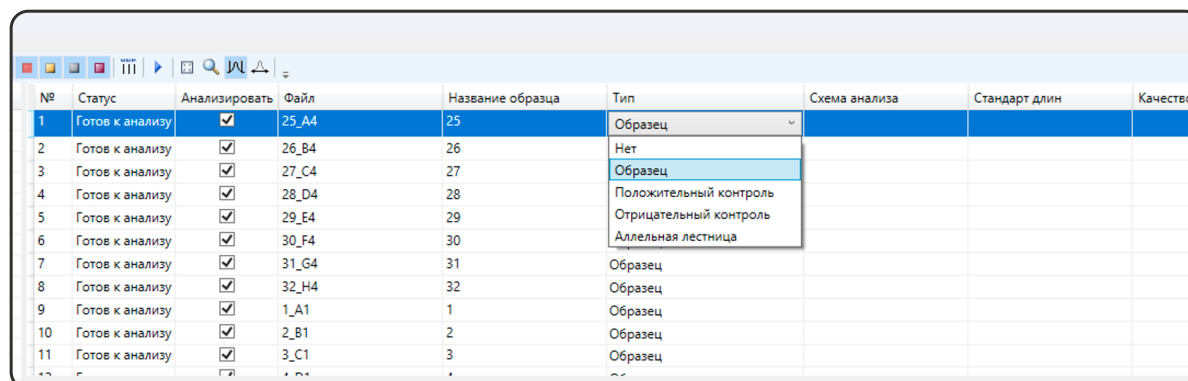
Отдельные файлы образцов. В меню **Файл** выбрать пункт **Добавить файлы** (или нажать кнопку [2]). В открывшемся окне отметить нужные файлы и нажать **Открыть**. К текущему проекту добавятся только они. Программа «ГенЭксперт «Виноград» также может анализировать файлы, полученные на приборах ABI Prism, имеющих расширение .fsa и .hid. Открыть такие файлы для анализа можно аналогично, с помощью опции **Добавить файлы** (или нажав кнопку [2]).

- [1]
- [2]

Имя	Дата изменения	Тип
Папка Logs	22.08.2025 14:59	Папка с файлами
Папка GE-Виноград сорта-220825_14_15_22_FSA	22.08.2025 14:58	Папка с файлами
1_A1.frf	22.08.2025 14:57	Файл "FRF"
2_B1.frf	22.08.2025 14:57	Файл "FRF"
3_C1.frf	22.08.2025 14:57	Файл "FRF"
4_D1.frf	22.08.2025 14:57	Файл "FRF"
5_E1.frf	22.08.2025 14:57	Файл "FRF"
6_F1.frf	22.08.2025 14:57	Файл "FRF"

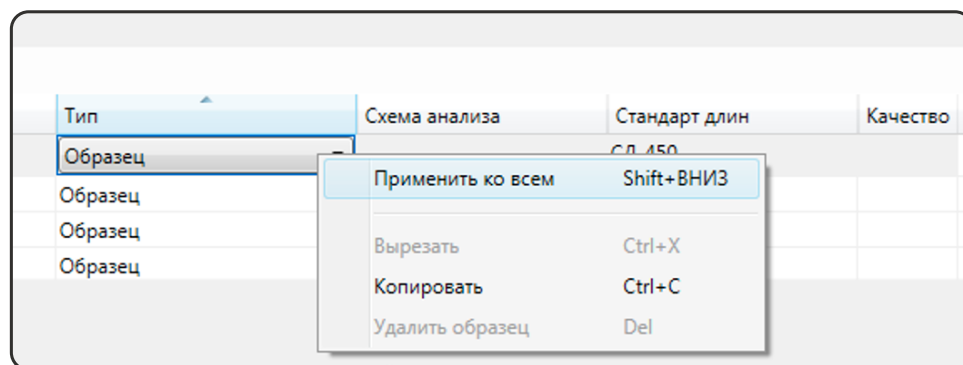
Перед проведением анализа необходимо убедиться, что для каждого образца заданы все необходимые параметры, а именно: **Тип, Схема анализа, Стандарт длин**.

Если данные параметры не заданы, то для каждого добавленного образца требуется их задать. В графе **Тип** выбрать нужный: **Образец, Положительный контроль, Отрицательный контроль, Аллельная лестница**.



№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин	Качество
1	Готов к анализу	☒	25_A4	25	Образец			
2	Готов к анализу	☒	26_B4	26	Нет			
3	Готов к анализу	☒	27_C4	27	Образец			
4	Готов к анализу	☒	28_D4	28	Положительный контроль			
5	Готов к анализу	☒	29_E4	29	Отрицательный контроль			
6	Готов к анализу	☒	30_F4	30	Аллельная лестница			
7	Готов к анализу	☒	31_G4	31	Образец			
8	Готов к анализу	☒	32_H4	32	Образец			
9	Готов к анализу	☒	1_A1	1	Образец			
10	Готов к анализу	☒	2_B1	2	Образец			
11	Готов к анализу	☒	3_C1	3	Образец			

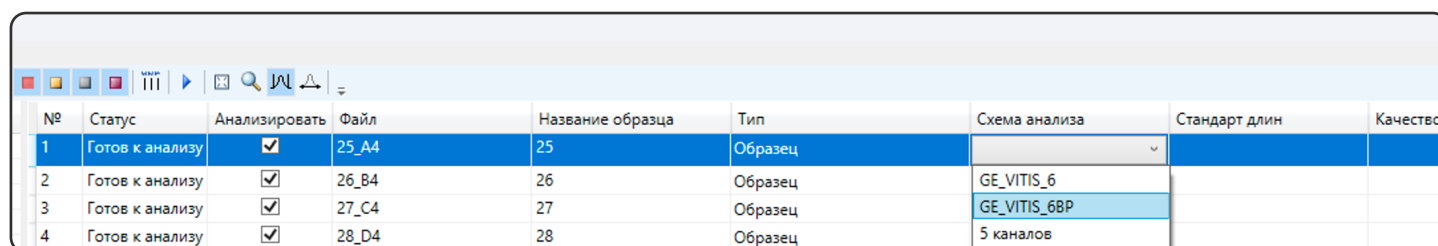
Для того, чтобы применить выбранный параметр ко всем ячейкам столбца (для всех образцов), нажать левой кнопкой мыши по пустой ячейке, затем правой кнопкой по уже заполненной ячейке. В выпадающем списке выбрать команду **Применить ко всем** (выполняется аналогично для всех столбцов таблицы).



Тип	Схема анализа	Стандарт длин	Качество
Образец		Ст. 450	
Образец			
Образец			
Образец			

ПРИМЕЧАНИЕ! Среди всех анализируемых образцов хотя бы один образец должен быть с типом Аллельная лестница

В графе **Схема анализа** выбрать «**GE_VITIS_6BP**».



№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин	Качество
1	Готов к анализу	☒	25_A4	25	Образец			
2	Готов к анализу	☒	26_B4	26	Образец	GE_VITIS_6		
3	Готов к анализу	☒	27_C4	27	Образец	GE_VITIS_6BP		
4	Готов к анализу	☒	28_D4	28	Образец	5 каналов		

В случае, если данная схема анализа отсутствует в списке, необходимо создать её, выполнив действия, описанные в **пункте 8.2**.

В графе Стандарты длин выбрать **СД-450** (по 6 каналу).

Свойство	Значение	NR	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин
Количество точек	4800	6	Готов к анализу	☒	30_F4	30	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Шаг по времени	0,25 с	7	Готов к анализу	☒	31_G4	31	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Комментарий		8	Готов к анализу	☒	32_H4	32	Долгая лестница	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Начало эксперимента	22.08.2025 11:59	9	Готов к анализу	☒	1_A1	1	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Начало сбора данных	15:21	10	Готов к анализу	☒	2_B1	2	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Высокое напряжение	12200 В	11	Готов к анализу	☒	3_C1	3	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Продолжительность ввода	00:00:05	12	Готов к анализу	☒	4_D1	4	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Напряжение при вводе	1800 В	13	Готов к анализу	☒	5_E1	5	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Продолжительность префореза	00:03:00	14	Готов к анализу	☒	6_F1	6	Положительный контроль	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Напряжение префореза	15000	15	Готов к анализу	☒	7_G1	7	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
NR капилляра	4	16	Готов к анализу	☒	8_H1	8	Образец	GE_VITIS_6BP	SD-450-6
Длина капилляра	36								

В случае, если необходимый стандарт длины отсутствует в списке, выполните действия, описанные в пункте 8.3, чтобы его создать.

В графе **Анализировать** отметить символом [1] каждый образец, для которого требуется провести анализ.

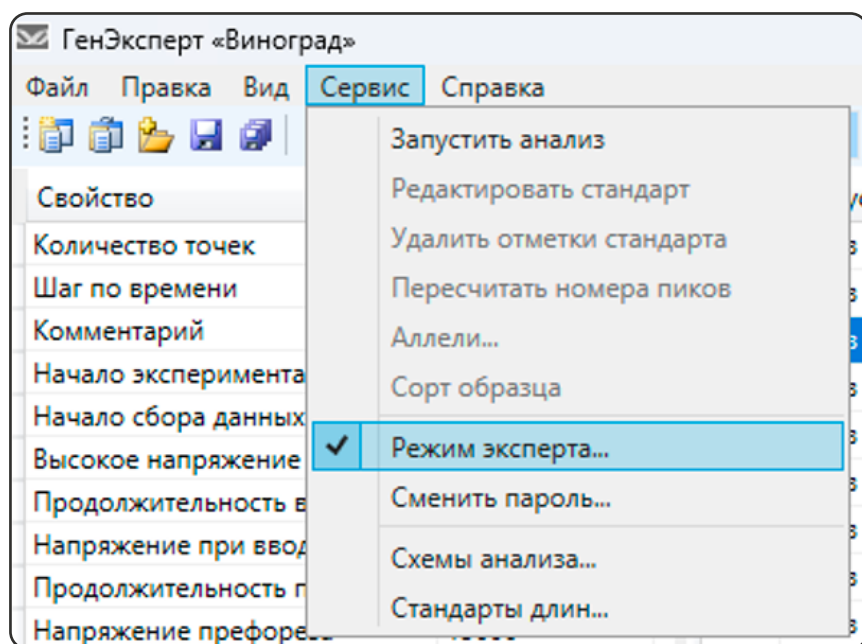
Нажать кнопку [2] **Запустить анализ**, которая находится на панели инструментов основного окна программы «ГенЭксперт «Виноград». Процесс выполнения анализа отображается на индикаторе [3] в строке состояния в нижнем левом углу окна. После завершения анализа появляется надпись **Готово**.



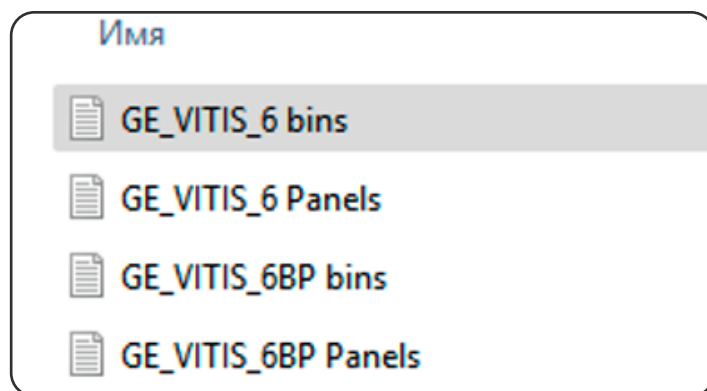
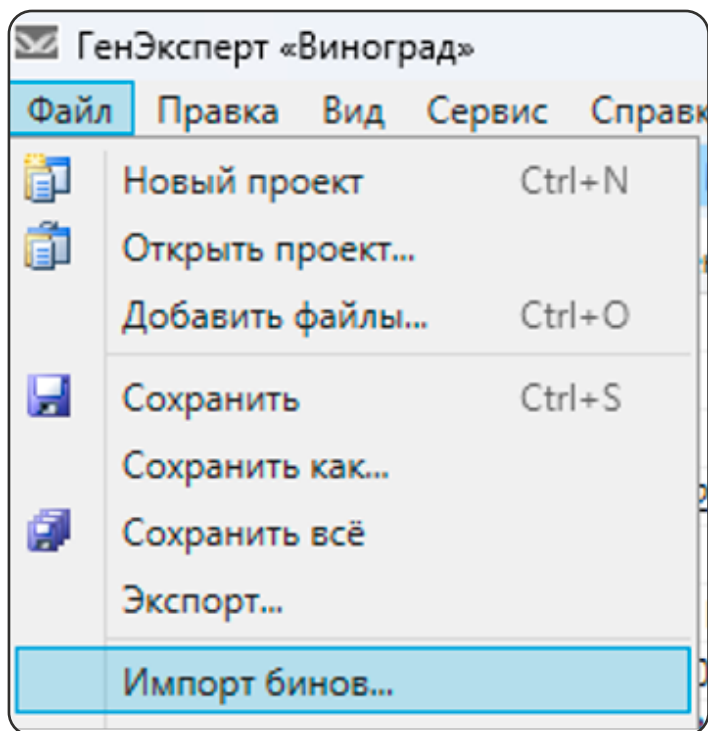
8.2 СОЗДАНИЕ СХЕМЫ АНАЛИЗА

Для удобства использования результатов анализа в базах генетических данных сортов винограда созданы 2 панели для обработки файлов фрагментного анализа. Первая панель формирует отчеты со значениями аллелей в локусах. Вторая панель формирует отчеты в длинах нуклеотидов.

Для изменения/создания параметров в программе, перейти в **Режим эксперта** (Пароль - Expert2).



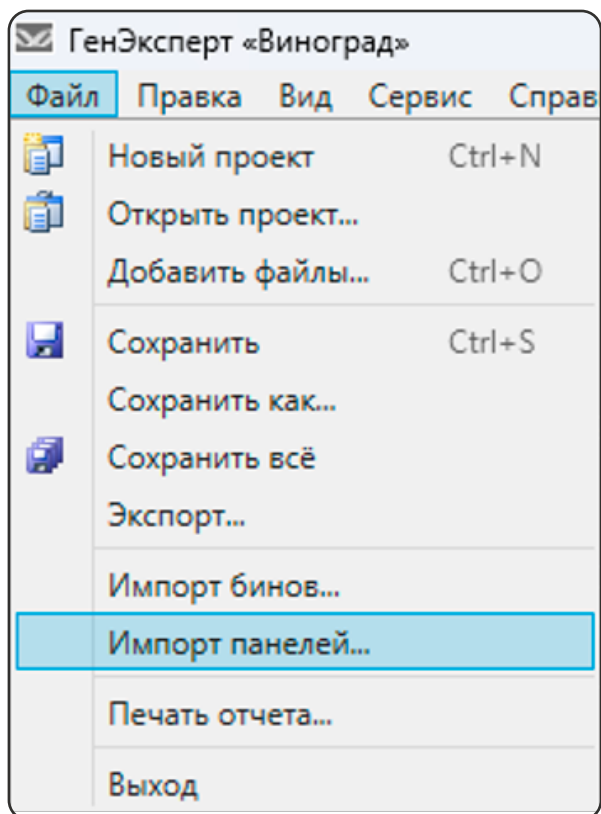
Шаг А – Импорт бинов/Экспорт
Перейти Файл - Импорт бинов
или выбрав Экспорт...



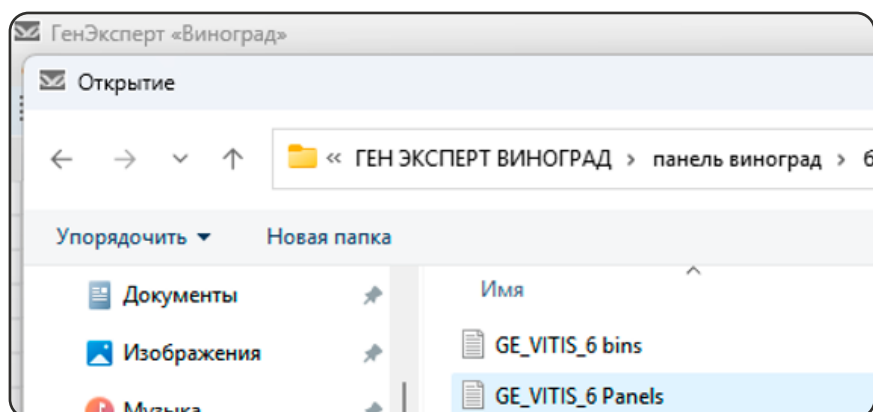
Выбрать в нужной директории файл с актуальными бинами (предоставляет разработчик программного обеспечения ИАП РАН. Если в папке отсутствует файл, запросить его у производителя наборов, скопировать в указанную папку и выбрать через опцию **Импорт бинов/Экспорт**.

Шаг Б – Импорт панелей

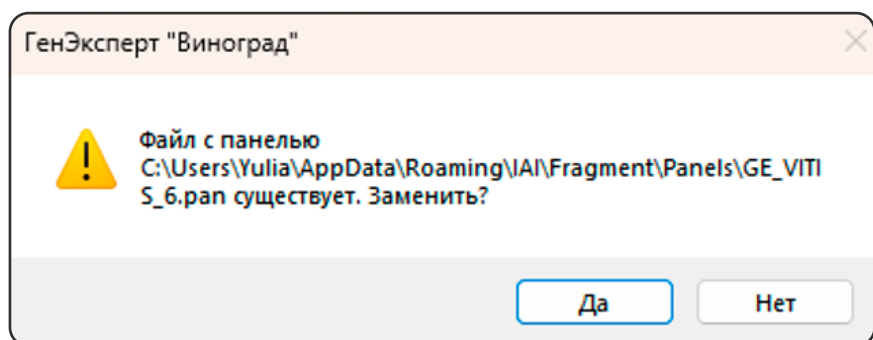
Перейти Файл – Импорт панелей/Экспорт



Импортировать панели аналогично шагу А.



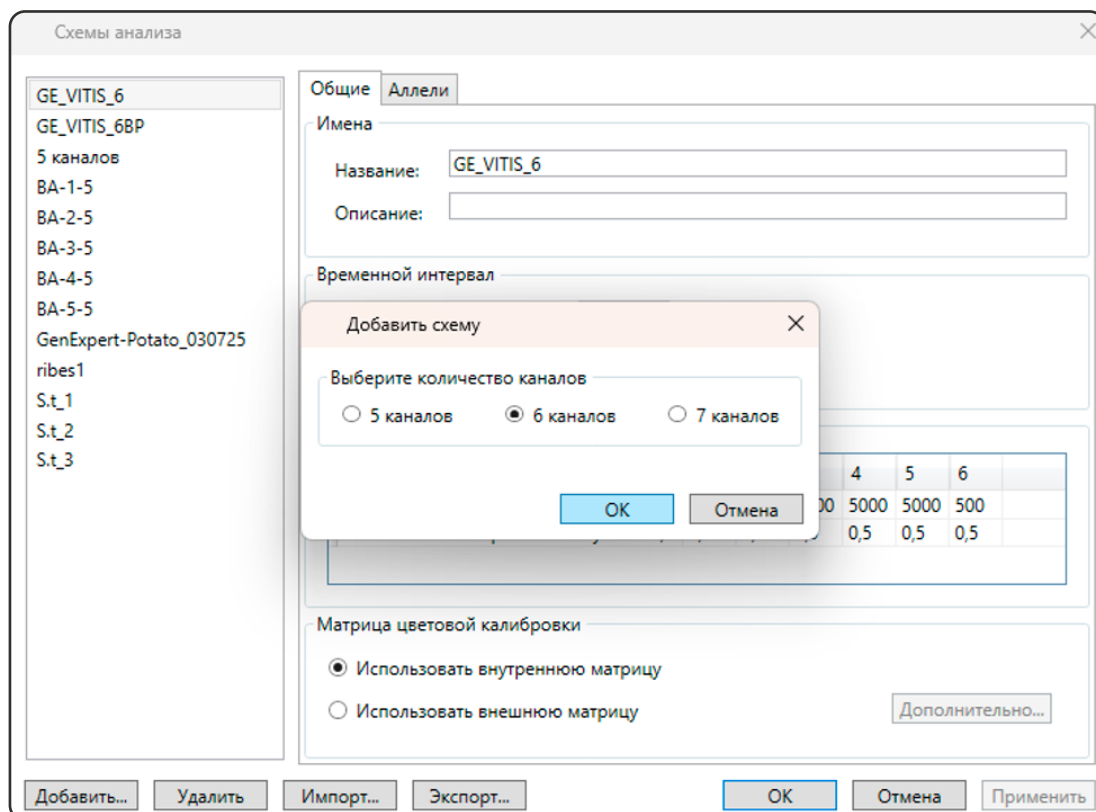
При условии, что бины и панели уже установлены, ПО может вывести окно:



Выбрать Да.

Шаг В – Создание схемы

Перейти в Сервис – Схемы анализа



В окне **Схемы анализа** нажать кнопку **Добавить**, в окне **Добавить схему** выбрать количество каналов – 6 и нажать ОК.

Во вкладке **Общие** внести «**Название панели**», в таблице **Характеристика пиков** установить рекомендованные производителем набора значения, и убедиться, что маркер [1] матрицы цветовой калибровки активирован для использования внутренней матрицы.



Минимальная высота пика по каналам:
1 – 5000; 2 – 5000; 3 – 5000; 4 – 5000; 5 – 5000; 6 – 500.
Минимальная ширина на полувысоте – 0,5 (для каждого пика).

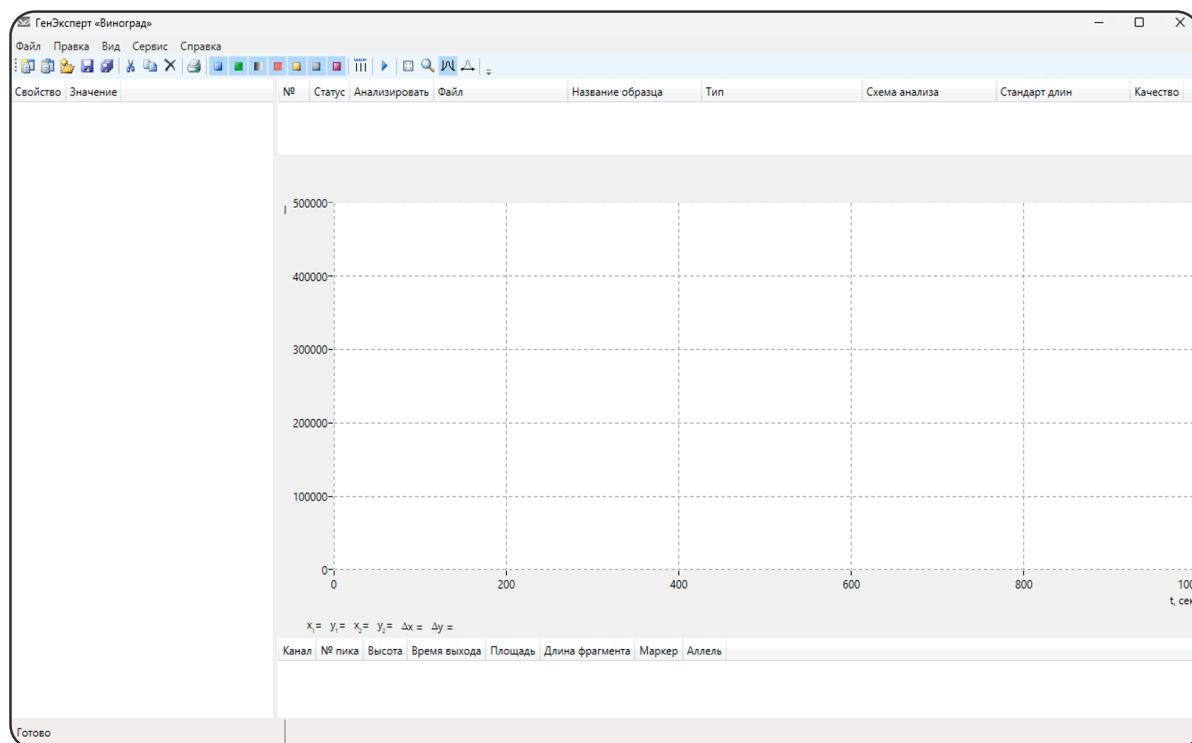
Во вкладке **Алели** развернуть список **Панель** и выбрать «ПАНЕЛЬ»

В таблице **Параметры** установить все значения равными 0 и нажать ОК.

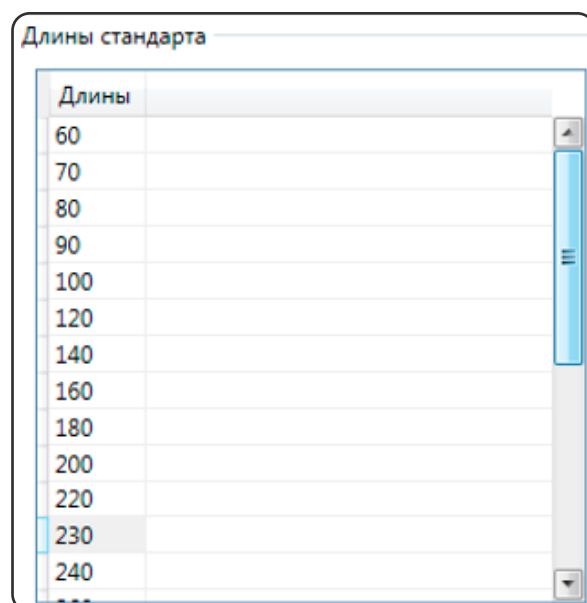
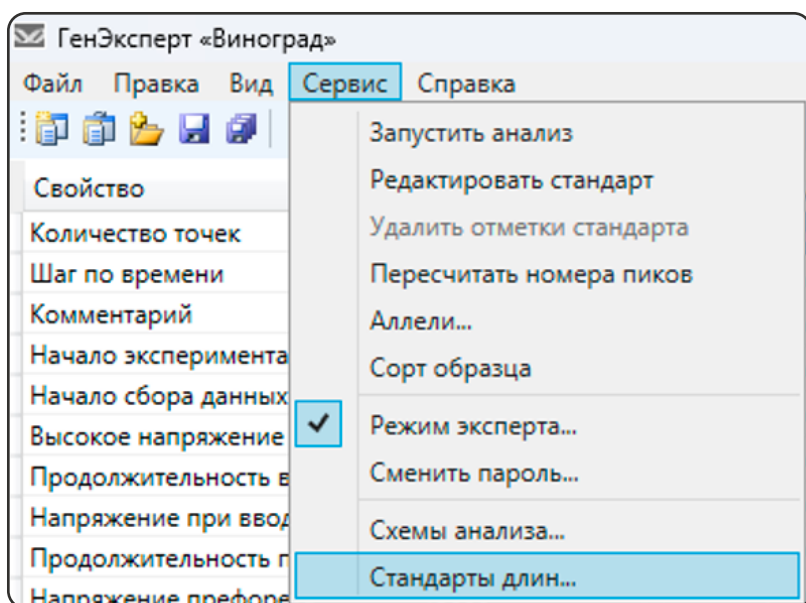
	Три	Тетра	Пента	Гекса
Уровень фильтрации минорных пиков	0	0	0	0
Соотношение минусА	0	0	0	0
Начальное расстояние минусА	0	0	0	0
Конечное расстояние минусА	0	0	0	0
Начальное расстояние минус статтера	0	0	0	0
Конечное расстояние минус статтера	0	0	0	0

8.3 СОЗДАНИЕ СТАНДАРТА ДЛИНЫ

Запустить программу «ГенЭксперт «Виноград». Откроется **Основное окно** программы.



1. Перейти **Сервис – Стандарты длин**.



2. В окне **Стандарты длин** нажать кнопку **Добавить**, в части окна **Параметры** ввести **Название** стандарта длины **СД-450**, а в списке **Канал** выбрать **№6**.

3. В таблице **Длины стандарта** ввести значения длин от меньших к большим в соответствии с данными, приведенными в пункте 8.4 и нажать **ОК**.

Стандарты длин

LIZ-500
LIZ1200
LIZ600
S-450
1200-800
380-5
380-6
450-5
450-6
cd1200-600-5
S-450-5
SD-450-5
SD-450-6
СД-600-5
СД-600-6
СД-600
сд1200-1000-6
сд1200-5
сд1200-800-5
сд1200

Добавить

Удалить

Параметры

Название: SD-450-6

Описание:

Канал: №6

Длины стандарта

Длины

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

OK

Отмена

8.4 СТАНДАРТ ДЛИНЫ СД-450

Ниже приводится пример электрофоретического разделения 24 фрагментов стандарта длины **СД-450** в канале детекции Sy660 (5 канал).

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.

Версия 1.1

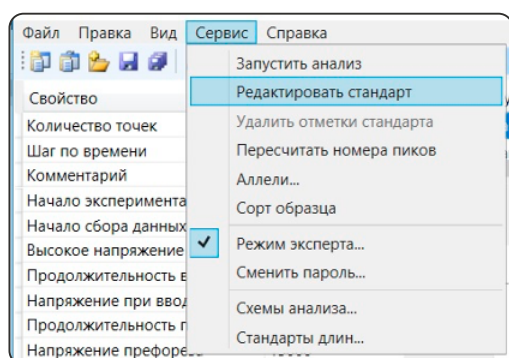
37

СИНТОЛ

8.5 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

После завершения анализа в графе **Качество** для каждого образца появляется оценка качества: *Хорошее* (найжены все пики размерного стандарта), *Среднее* (не найден один пик размерного стандарта) или *Плохое* (не найдено более одного пика размерного стандарта). Для получения итогового протокола анализа пригодны образцы с качеством *Хорошее* и *Среднее*. Для образцов с оценкой качества *Плохое* необходимо, в случае видимого отсутствия пиков размерного стандарта, повторить анализ с момента приготовления образца для электрофореза. В случае наличия пиков стандарта длин, необходимо произвести их расстановку «вручную». Для этого нужно:

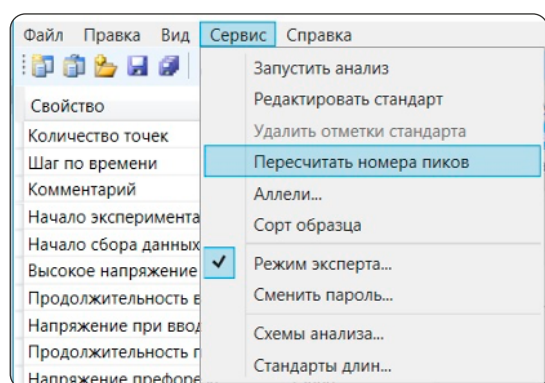
1. Оставить только канал [1], соответствующий красителю, входящему в состав фрагментов стандарта длины (5 канал).
2. Перейти **Сервис – Редактировать стандарт**.



3. Ввести в столбце **Длина фрагмента** значения, соответствующие пикам стандарта длин, и каждый из них отметить [2] как **Пик стандарта**.

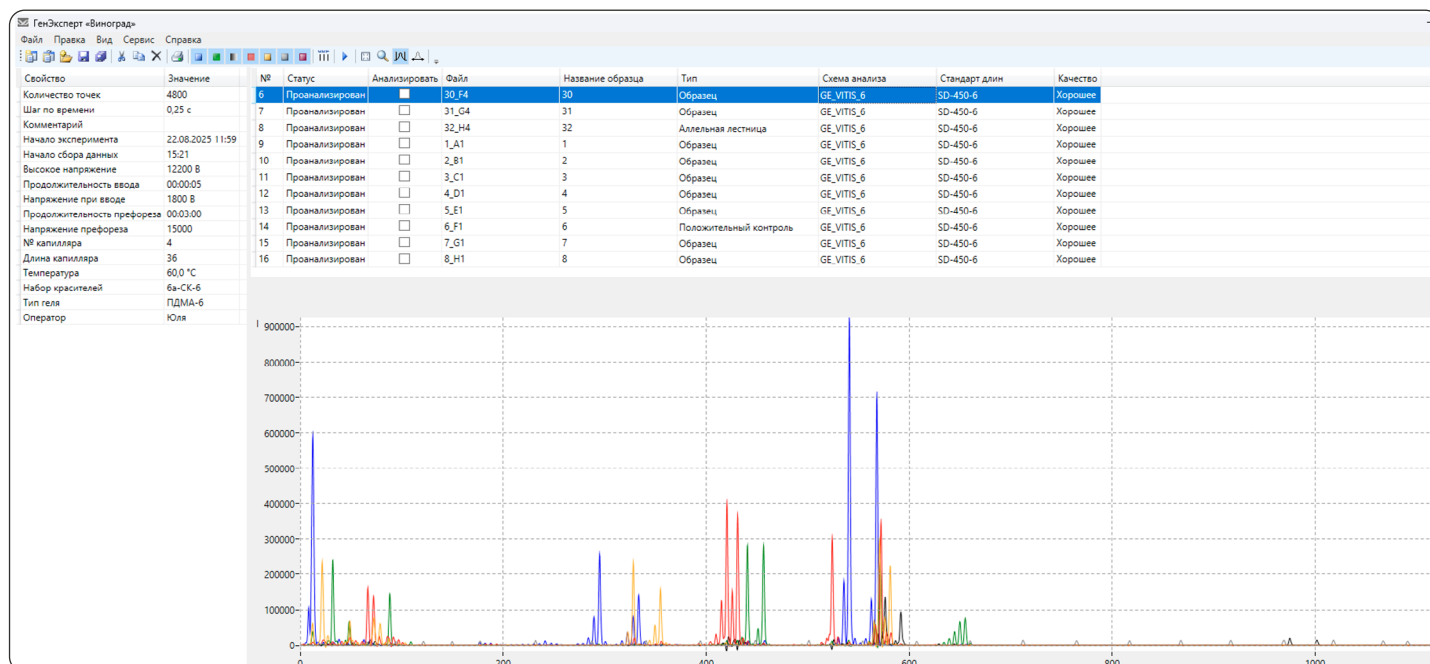
№ образца	Канал	№ пика	Высота	Время выхода	Ширина на полувысоте	Длина фрагмента	Пик стандарта	Маркер	Алель	Качество
5	673	997	1608,6	1,11	0,0		☐			Хорошее
5	674	8927	1621,4	2,57	360,0		☐			Хорошее
5	675	979	1648,5	0,72	0,0		☐			Хорошее
5	676	1426	1653,8	2,27	0,0		☐			Хорошее
5	677	1039	1699,9	1,88	0,0		☐			Хорошее
5	678	6039	1708,9	2,53	380,0		☒			Хорошее
5	679	1154	1713,1	0,94	0,0		☐			Хорошее
5	680	18357	1782,0	2,80	0,0		☐			Хорошее
5	681	5104	1796,0	2,64	400,0		☒			Хорошее
5	682	850	1861,2	1,71	0,0		☐			Хорошее
5	683	5739	1881,2	2,95	420,0		☒			Хорошее
5	684	969	1915,9	1,14	0,0		☐			Хорошее
5	685	3662	1964,2	2,86	440,0		☒			Хорошее
5	686	5751	2001,5	2,79	450,0		☒			Хорошее

4. Перейти **Сервис – Пересчитать номера пиков**.



[1]  [2] 

Пример результата анализа с оценкой качества *Хорошее* приведен ниже:

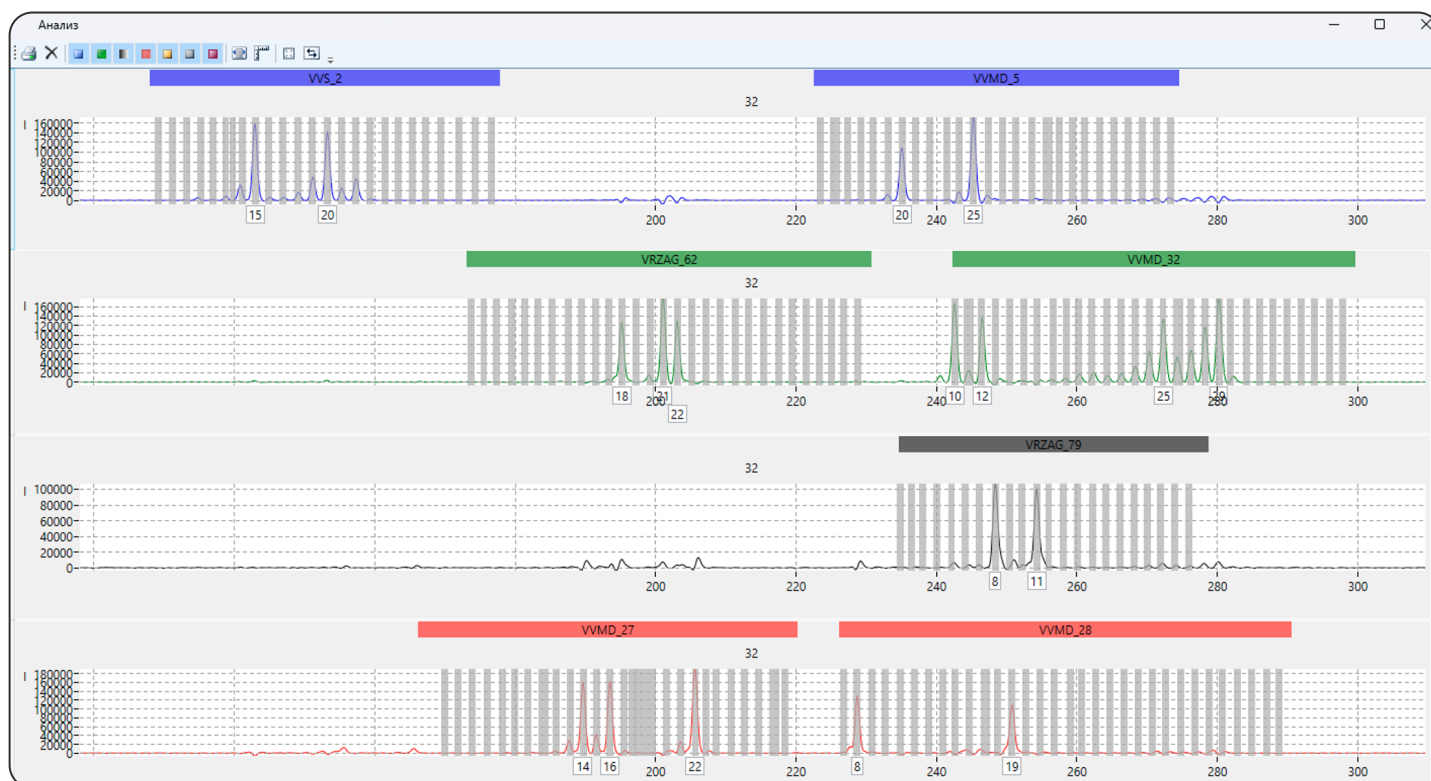


Результаты анализа образцов с оценкой качества *Хорошее* и *Среднее* доступны для просмотра в окне **Алели** (кнопка [1]). Для анализа результатов рекомендуется следующий алгоритм:

[1]

Шаг А — Анализ аллельной лестницы

Важно! Проводится при оценке качества *Хорошее* или *Среднее*. Если для аллельной лестницы качество определено как *Плохое*, повторный электрофорез необходимо провести для всей серии образцов



1. В основном окне программы «ГенЭксперт Виноград» выделить строку с аллельной лестницей и нажать кнопку Аллели.
2. Можно выбрать кнопку [1] **Печать** или визуально убедиться, что все пики фрагментов аллельной лестницы имеют под осью X значения, соответствующие их длине и количеству коротких tandemных повторов.
3. Если пики фрагментов аллельной лестницы не соответствуют их длине и количеству коротких tandemных повторов, то необходимо произвести редактирование бинов или прогона фрагментного анализа.

[1] 

локус	аллель	пн
VVS_2_FAM	15	137
	20	147
VVMD_5_FAM	20	230
	25	240
VRZAG_62_R6G	18	186
	21	192
	22	194
VVMD_32_R6G	10	236
	12	240
	25	266
	29	274
VRZAG_79_Tamra	8	239
	11	245
VVMD_27_ROX	14	186
	16	190
	22	202
VVMD_28_ROX	8	218
	19	240
VVMD_25_Sy630	10	239
	15	249
VVMD_7_Sy630	11	239
	13	243

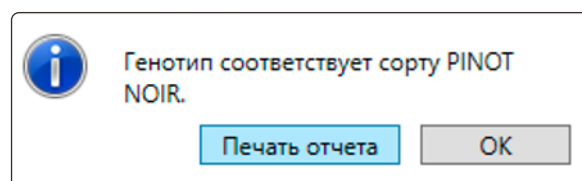
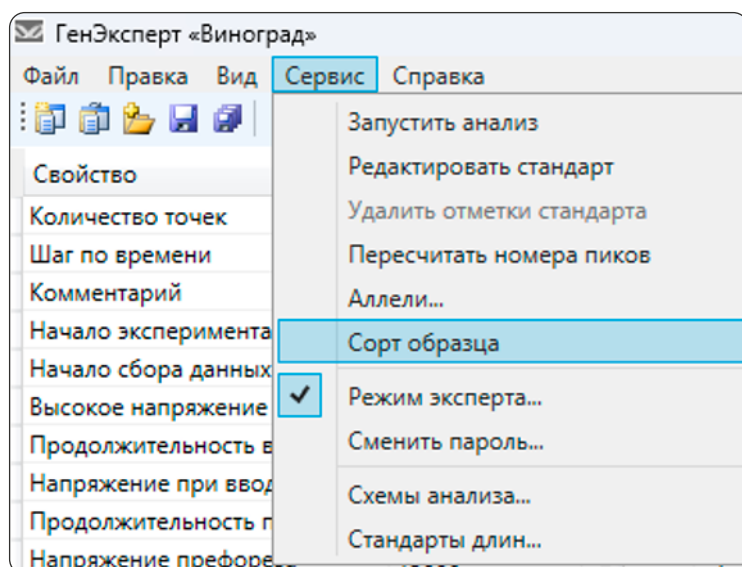
Пример ПКО.

ПКО-ГЭ-В		
локус	аллель	пн
VVS2	15	137
	22	151
VVMD5	20	230
	25	240
VRZAG62	19	188
	22	194
VVMD32	12	240
	28	272
VRZAG79	8	239
	11	245
VVMD27	14	186
	16	190
VVMD28	8	218
	17	236
VVMD25	10	239
	15	249
VMMD7	11	239
	13	243

Шаг Б – Анализ положительного контрольного образца (ПКО) и образцов

Аналогично процедуре, описанной для анализа аллельной лестницы, анализируются все остальные образцы с оценкой качества *Хорошее* и *Среднее*.

Для образцов с качеством *Плохое*, необходимо провести расстановку пиков размерного стандарта «вручную».





научно-производственная компания

Ген-эксперт Виноград

Ф. И. О. эксперта _____

Дата _____ 20__ г.

Протокол исследования

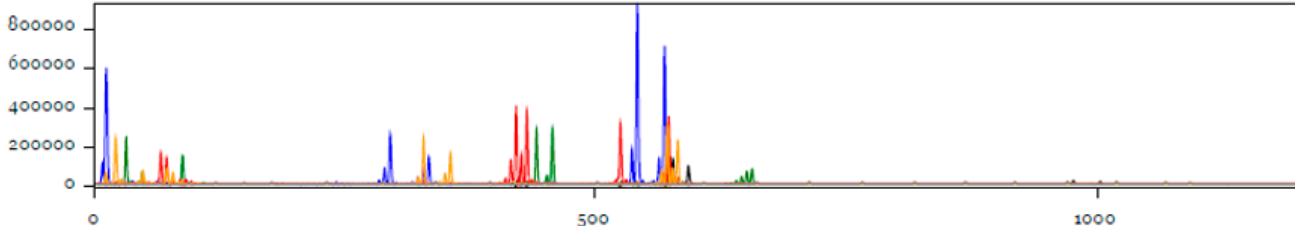
Заключение: Генотип соответствует сорту Pinot Noir

Генотип 9 локусов

№	Образец	VVS_2	VVMD_5	VRZAG_62	VVMD_32	VRZAG_79	VVMD_27	VVMD_28	VVMD_25	VVMD_7
		127-178	222-274	173-229	240-300	233-278	169-220	226-291	150-190	235-277
1	30	15-22	20-25	19-22	12-28	8-11	14-16	8-17	10-15	11-13
	Pinot Noir	15-22	20-25	19-22	12-28	8-11	14-16	8-17	10-15	11-13

Общая хроматограмма

№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин	Качество
1	Проанализирован	✓	30_F4	30	Положительный контроль	GE_VITIS_6	SD-450-6	Хорошее

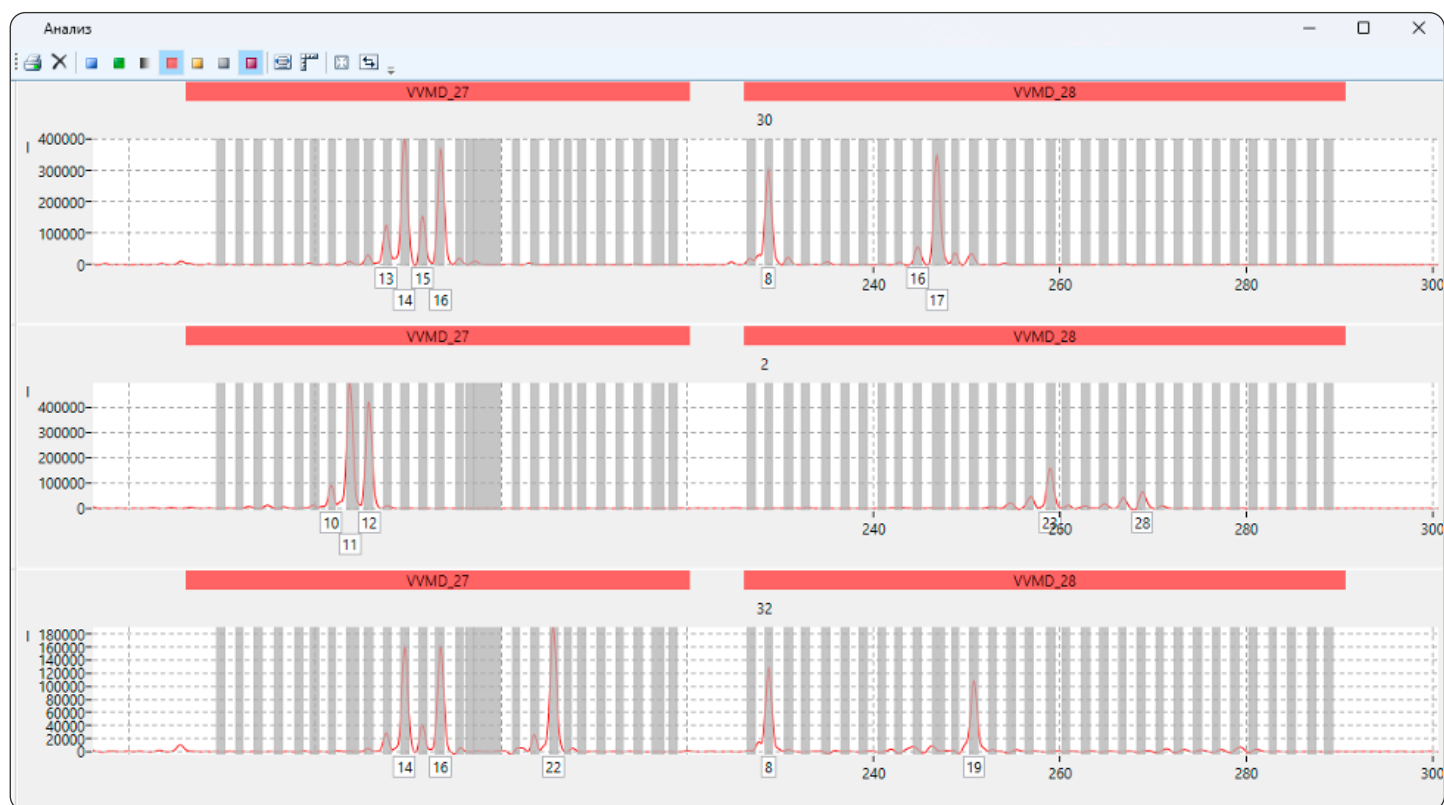


Результат анализа сорта Pinot Noir, полученный с помощью набора «ГенЭксперт Виноград»

Для сравнения результатов нескольких образцов следует отметить эти образцы в таблице **Параметры образцов**, удерживая клавишу Ctrl. Затем нажать кнопку **Аллели**.

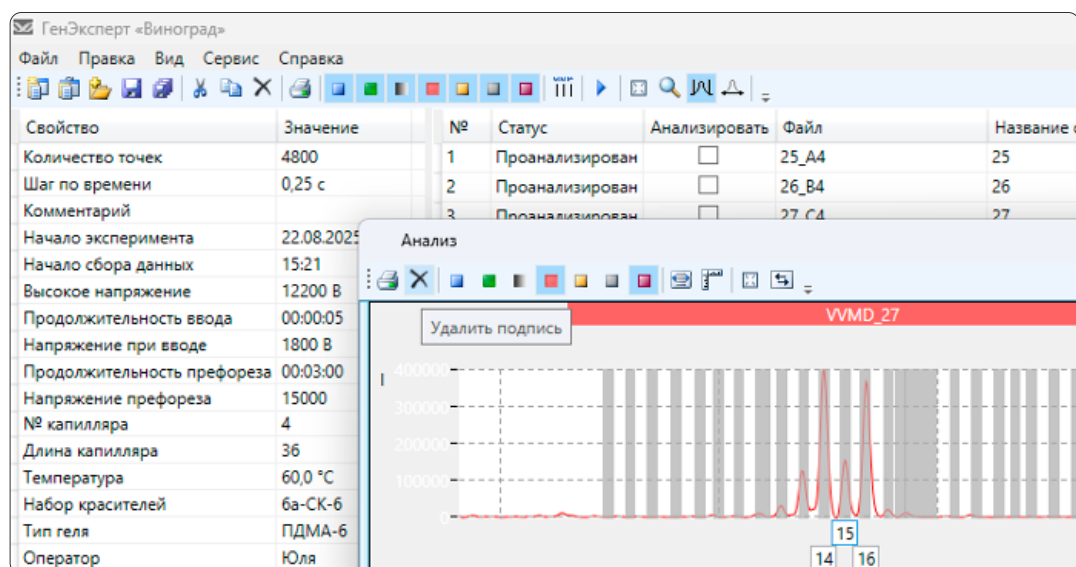
Отключая последовательно кнопки отображения каналов детекции [2] можно получить в окне совмещенные электрофореграммы нескольких образцов. Далее показан одновременный просмотр результатов анализа аллельной лестницы и двух сортов картофеля по каналу **ROX**:





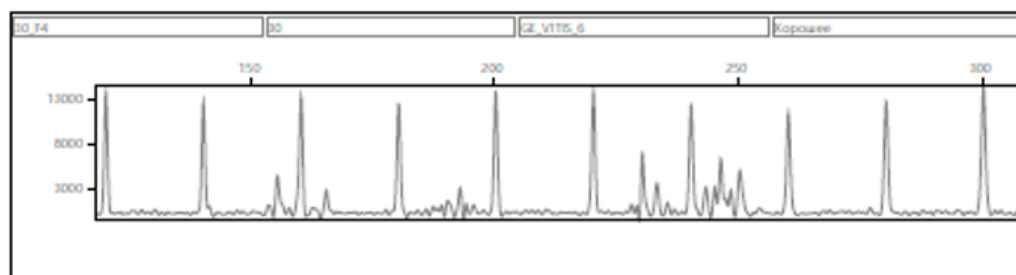
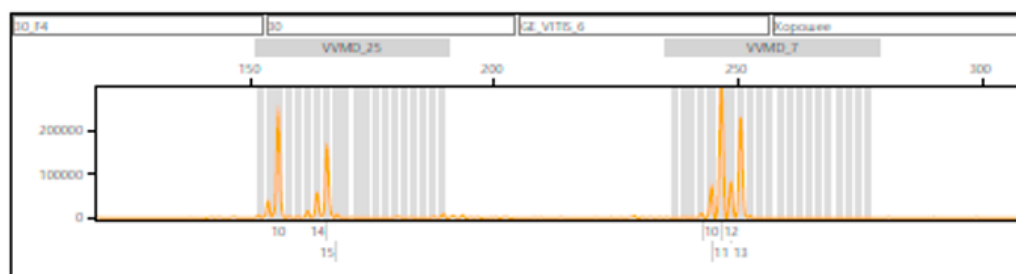
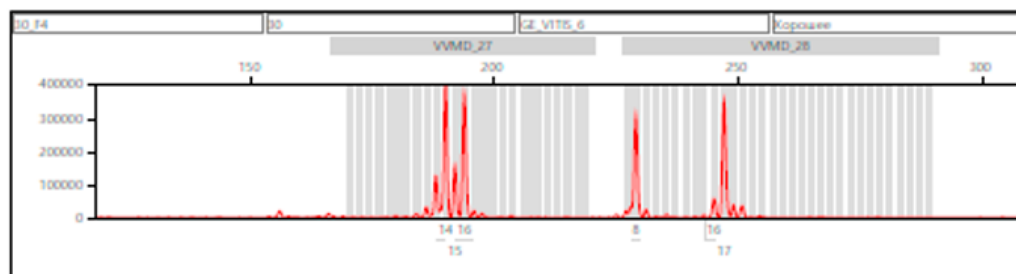
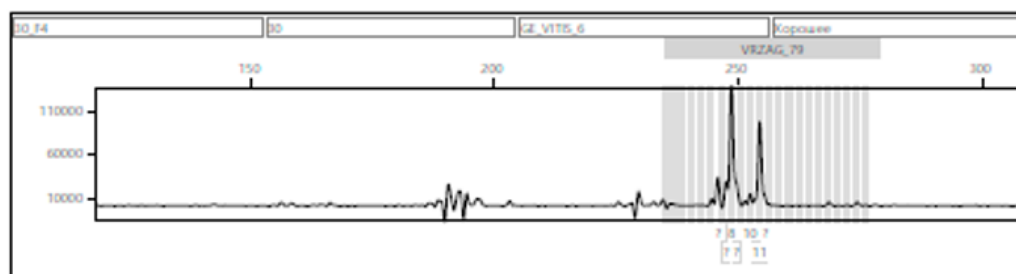
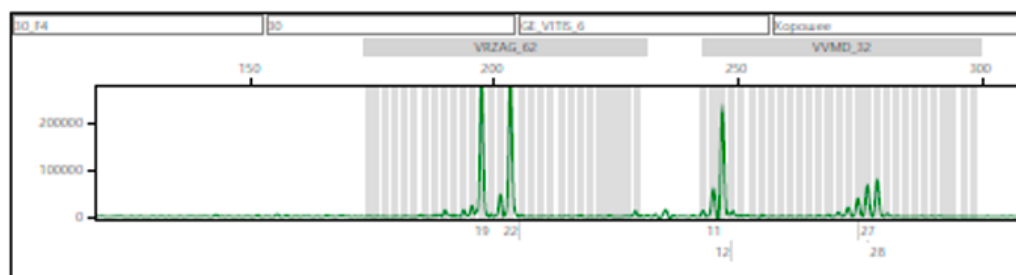
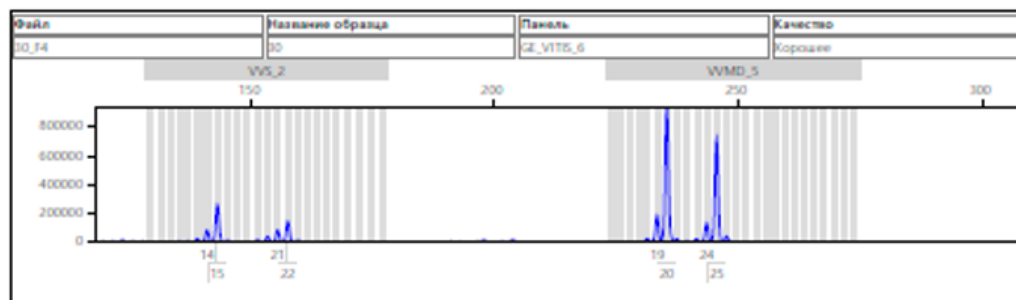
Отсечь пики с интенсивностью меньшей, чем задана в поле **Порог**, можно нажав на кнопку [3] **Применить порог**. Для обновления результата после применения порога необходимо закрыть окно **Аллели** и открыть его заново.

Удалить подпись аллели под пиком можно, выставив курсор в соответствующий квадрат и нажать кнопку [3] **Удалить подпись**.



Для получения протокола исследования выполнить команды: **Файл-Печать** [4]
Программа выдаст отчет на двух листах.

[1] ✕ [2] 🖨️



8.6 ФОРМИРОВАНИЕ ПРОТОКОЛА ИССЛЕДОВАНИЯ

Протокол исследования формируется автоматически при нажатии кнопки **Печать протокола**. Программа выдает отчет на трех листах: общее заключение, хроматограмма по каналам и раскладка аллельной лестницы.



Ген-эксперт Виноград

Ф. И. О. эксперта _____
Дата _____ 20__ г.

Протокол исследования

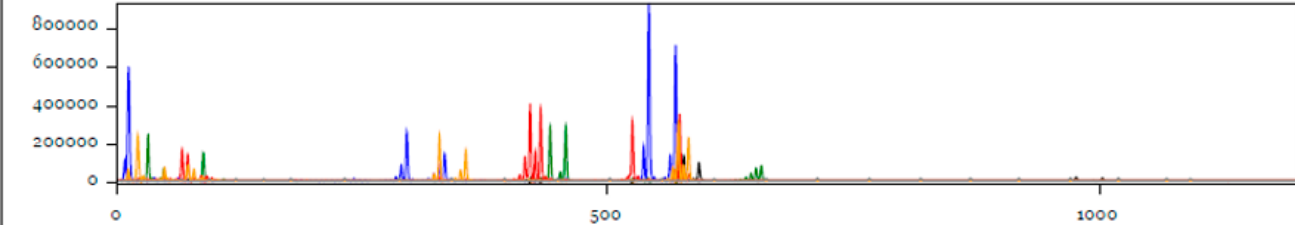
Заключение: Генотип соответствует сорту Pinot Noir

Генотип 9 локусов

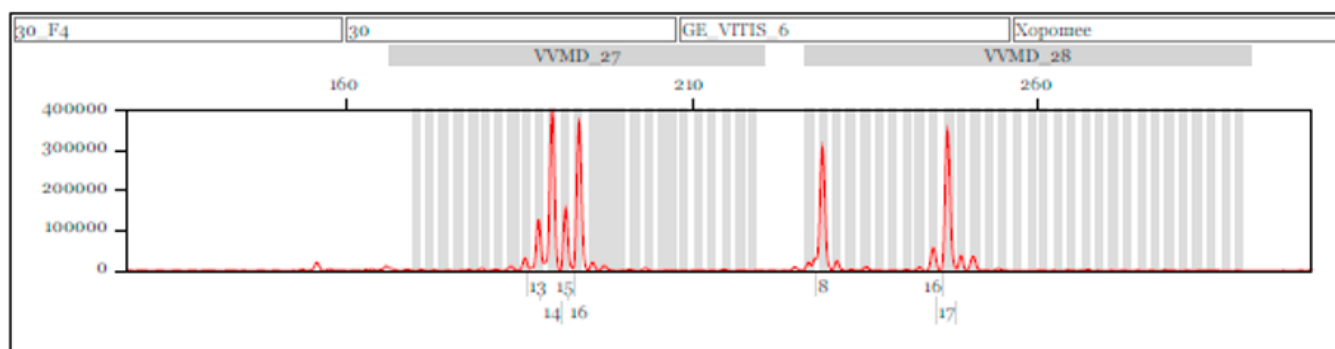
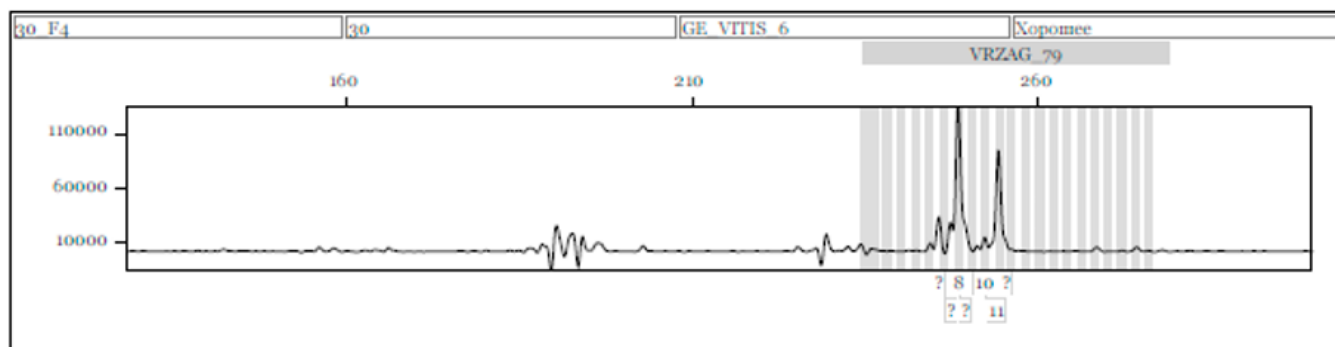
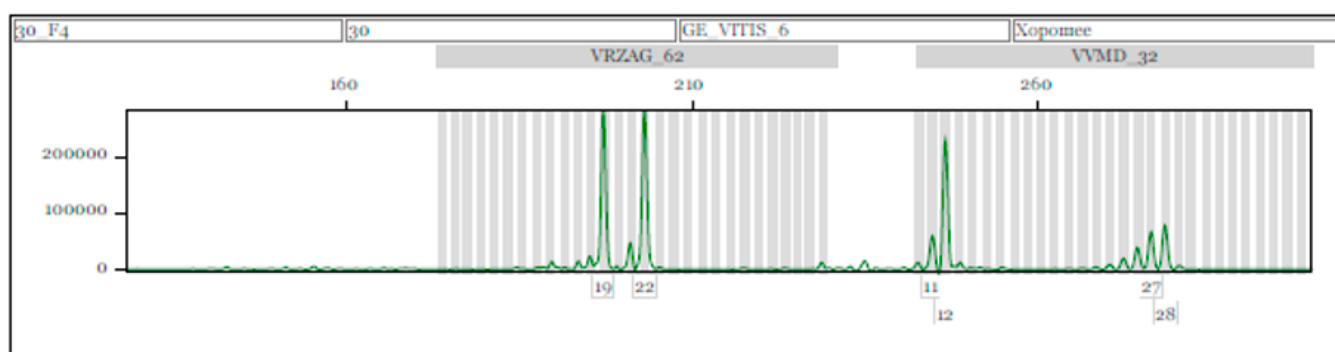
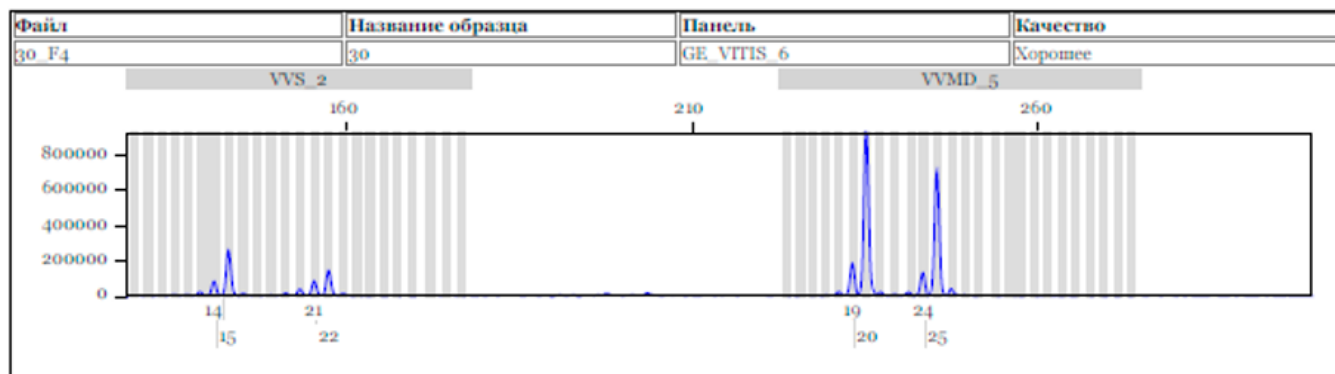
№	Образец	VVS_2	VVMD_5	VRZAG_62	VVMD_32	VRZAG_79	VVMD_27	VVMD_28	VVMD_25	VVMD_7
		127-178	222-274	173-229	240-300	233-278	169-220	226-291	150-190	235-277
1	30	15-22	20-25	19-22	12-28	8-11	14-16	8-17	10-15	11-13
	Pinot Noir	15-22	20-25	19-22	12-28	8-11	14-16	8-17	10-15	11-13

Общая хроматограмма

№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длины	Качество
1	Проанализирован	✓	30_F4	30	Положительный контроль	GE_VITIS_6	SD-450-6	Хорошее

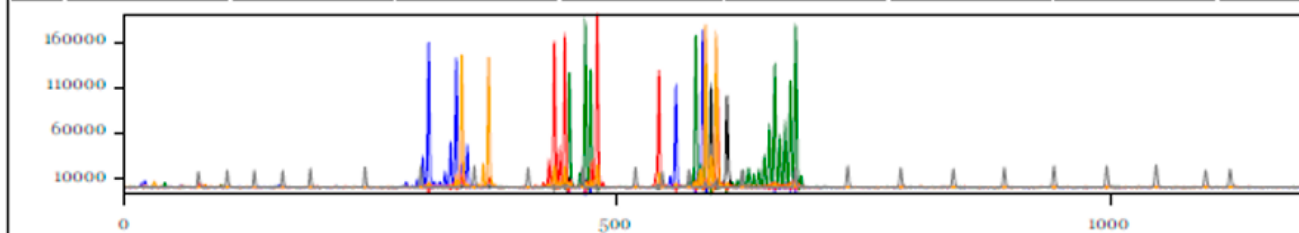


Панель аллелей по 9 локусам



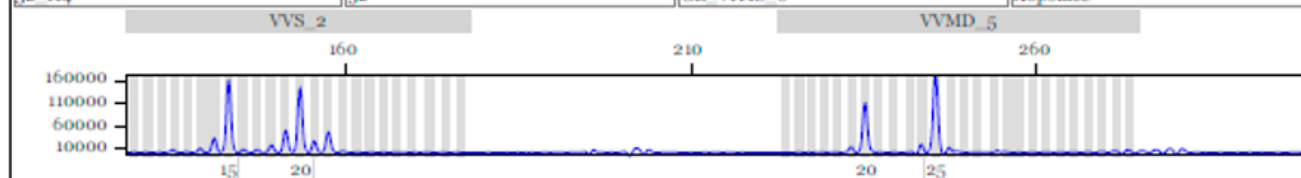
Общая хроматограмма аллельной лестницы

№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длины	Качество
1	Проанализирован	✓	32_H4	32	Аллельная лестница	GE_VITIS_6	SD-450-6	Хорошее

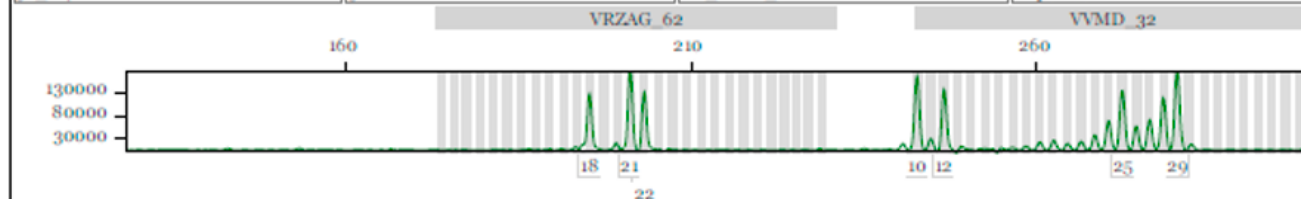


Панель аллелей по 9 локусам

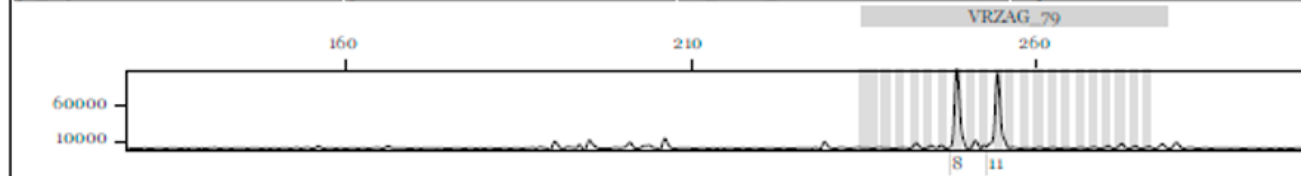
Файл	Название образца	Панель	Качество
32_H4	32	GE_VITIS_6	Хорошее



Файл	Название образца	Панель	Качество
32_H4	32	GE_VITIS_6	Хорошее



Файл	Название образца	Панель	Качество
32_H4	32	GE_VITIS_6	Хорошее



Файл	Название образца	Панель	Качество
32_H4	32	GE_VITIS_6	Хорошее

