

Руководство пользователя

Набор «ГенЭксперт – Виноград»



Оглавление

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ	3
1.1 Обоснование необходимости разработки и использования продукта	3
1.2 Описание набора	4
1.3 Компоненты набора и состав	6
1.4 Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование.....	7
1.5 Условия хранения	8
1.6 Основные характеристики набора	8
1.7 Гарантии качества	9
2. МЕТОДИКА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК.....	9
3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК	9
4. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ.....	9
4.1 Положительный контрольный образец	9
4.2 Аллельная лестница	10
5. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	10
5.1 Подготовка к проведению реакции амплификации	10
5.2 Условия амплификации	11
6. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05	11
6.1 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	12
6.2 Запуск фрагментного анализа	12
7. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «GeneMarker».....	13
7.1 Импорт файлов для анализа данных	13
7.2 Создание проекта анализа данных	14
7.3 Размерный стандарт СД-450.....	21
7.4 Анализ аллельной лестницы	22
7.5 Анализ положительного контрольного образца ПКО-ГЭ-В	23
7.5 Анализ отрицательного контрольного образца	26
7.6 Анализ сорта образца	26
8. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	30

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:

- Ускорение селекционного процесса
генотипирование позволяет идентифицировать гены, ответственные за ключевые ценные признаки:
 - устойчивость к болезням (милдью, оидиум, филлоксеры)
 - адаптацию к климатическим изменениям (засухоустойчивость, морозостойкость)
 - качество ягод (сахаристость, кислотность, содержание ароматических веществ) и сокращать сроки создания сортов.
- 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)
 - Оптимизация виноградников и управление генетическим разнообразиемАнализ генетического профиля помогает:
 - подбирать оптимальные комбинации подвоев и привоев
 - избегать близкородственного скрещивания
 - сохранять редкие и аборигенные сорта
- 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
 - 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.

1.2 Описание набора

ГенЭксперт “Виноград”


 SCINTOL
 НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ


«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, VVMD7 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

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'

длины СД-450 мечены пятым флуоресцентным красителем Sy660 и детектируются в канале LIZ одновременно с продуктами ПЦР.

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). 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 AT(CT) ₁₁ ATAG(AT) ₃	XVI
3	VRZAG62	6R6G	173-227	(CT) _n	VII
4	VVMD32	6R6G	239-300	(CT) _n	IV

5	VRZAG79	6TMR	233-270	(CT)n	V
6	VVMD27	6ROX	169-220	(TC)n	V
7	VVMD28	6ROX	226-281	(CT)n	III
8	VVMD25	6Sy630	150-190	(CT)n	XI
9	VMMD7	6Sy630	235-274	(GA)n	VII

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

Название	Реакций в наборе	Каталожный номер
«ГенЭксперт-Виноград»	48	ГЭ-В-48

1.3 Компоненты набора и состав

№	Компонент	Количество
1	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ГЭ-В-48, 0.2 мл.	6 стрипов по 8 микропробирок
2	Раствор активатора РА-ГЭ-В, 0,8 мл.	2 пробирки
3	Положительный контрольный образец, ПКО-ГЭ-В, 20 реакций	1 пробирка
4	Аллельная лестница, АЛЛ-ГЭ-В, 20 нанесений	1 пробирка
5	Стандарт длины, СД-450, 120 мкл	1 пробирка
6	Спектральный калибратор ба-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. и 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 (рис. 2, стр. 41). 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.

1.4 Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование

Реагент	Производитель	Каталожный номер
“СОРБ-ГМО-Б” (ЦТАБ + сорбент) Набор реагентов 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
Оборудование	Производитель	Каталожный номер
Высокоскоростная центрифуга (Eppendorf 5424 или аналог)		
Центрифуга, охлаждаемая, с ротором для 96-луночных планшето (Eppendorf 5810 R или аналог)		
Вакуумный испаритель с ротором для 96-луночных планшето (Eppendorf Concentrator plus или аналог)		
Амплификатор для 96-луночных планшето ДТ Классик	ООО «ДНК-Технология»	
Микроцентрифуга-встряхиватель «Циклотемп-901»	Циклотемп	
Микроцентрифуга для стрипованных пробирок «Циклотемп-903» (Циклотемп)	Циклотемп	

Термостат твердотельный с нагреваемой крышкой «Циклотемп-303» (Циклотемп)	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» (Синтол)	ООО «СИНТОЛ»	
Штатив «рабочее место» 48×2×0,2мл «PM-2X48X0,2» (Синтол)	ООО «СИНТОЛ»	
Штатив для переноса пробирок 96×0,2 мл «ПЦР-96» (Синтол)	ООО «СИНТОЛ»	
Штатив магнитный для выделения ДНК «М-24»	ООО «СИНТОЛ»	
Отсасыватель медицинский «ОМ-1»	Утёс	
Камера для горизонтального электрофореза «SE-1 или SE-2»	Хеликон	
Источник питания «Эльф-4»	ООО «ДНК-Технология»	
Трансillюминатор «КвантМ-312Б», 20 x 20 см	Хеликон	
Система гель-документирования «Взгляд»	Хеликон	

1.5 Условия хранения

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

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

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

Спектральный калибратор ба-СК-6 и размерный стандарт СД-450 хранить при –20°C.

1.6 Основные характеристики набора

Количество одновременно анализируемых маркеров — 9.

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 6.

Оптимальное количество вносимой ДНК – 5 нг.

1.7 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». Контактная информация указана в главе 8.

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 отбора пробы 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 (ООО «НПФ Синтол», каталожный номер 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, а также степень ее чистоты, можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее.

Для оценки чистоты препарата ДНК проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 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°C. 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°C. 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 dd H 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 наконечники 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, TE с 0,1 мМ ЭДТА).

Высокая концентрация ЭДТА в растворе ДНК может быть причиной снижения эффективности реакции вследствие хелатирования ионов магния.

С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контроль (1 мкл ПКО-ГЭ-В), один отрицательный контроль (деионизированная вода dd H₂O).

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

После завершения программы ПЦР, амплифицированные продукты можно хранить неделю при 2...8⁰C в защищенном от света месте. В случае, если амплифицированные продукты необходимо хранить более недели, рекомендуется заморозка при –20⁰C.

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 ба-СК-6 (ООО «Синтол»), который входит в состав набора.

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-формаמיד	10
Стандарт длины СД-450	1

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

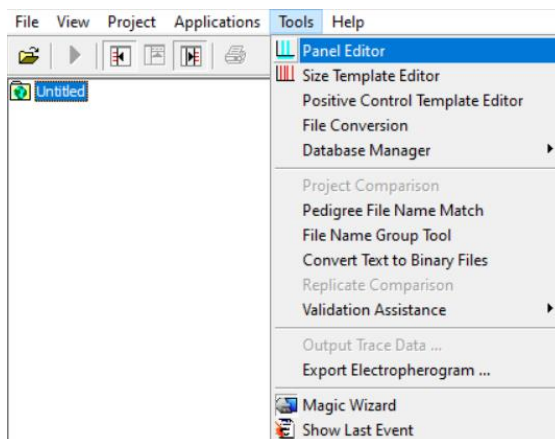
7. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «GeneMarker».

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

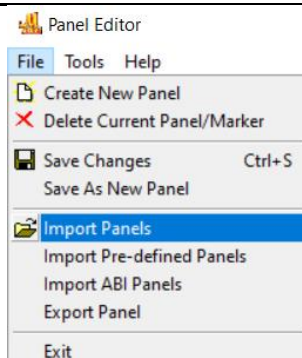
7.1 Импорт файлов для анализа данных

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

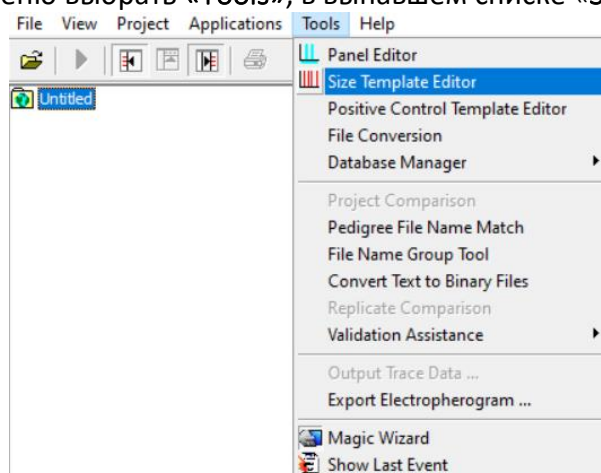
1. Запустить программу «GeneMarker». В верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor»



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



3. Выбрать папку с файлом панели «GenExpert-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»



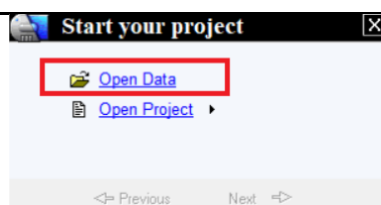
6. В открывшемся окне выбрать «File» в выпавшем списке «Import Size Standard»



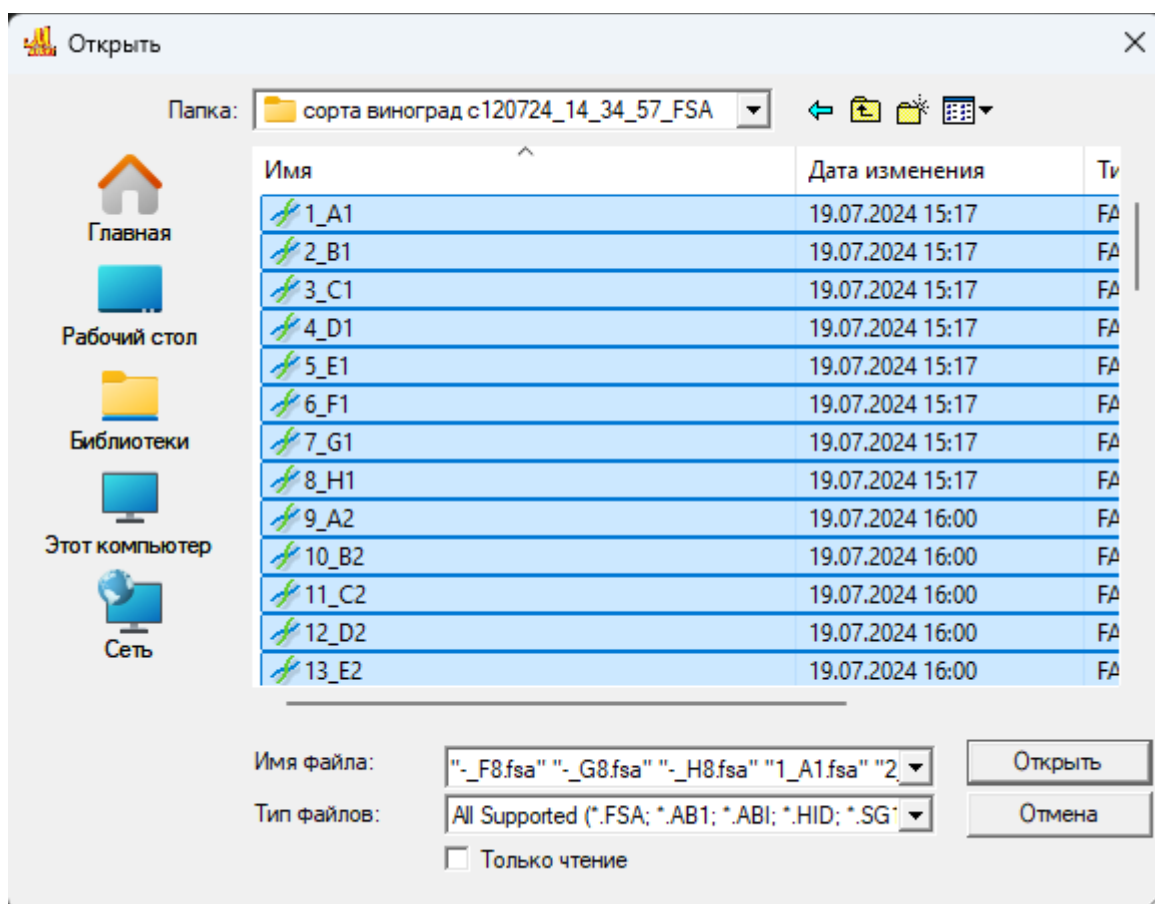
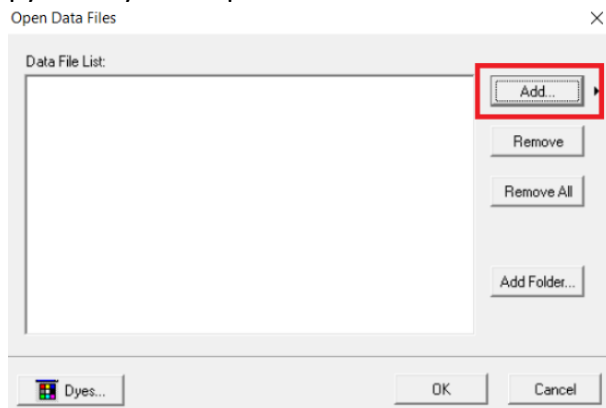
7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта SD450 и подгрузить его в программу «GeneMarker»
8. Закрыть окно «Size Template Editor»

7.2 Создание проекта анализа данных

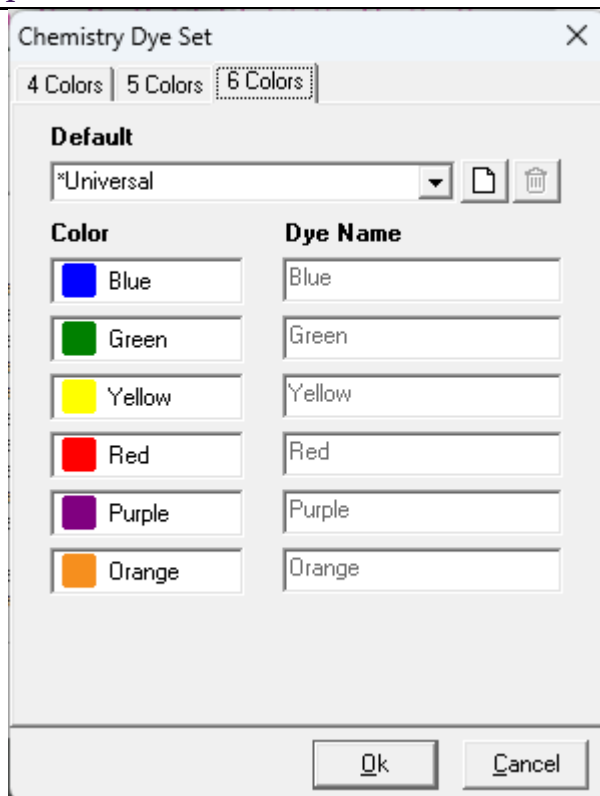
1. Запустить программу «GeneMarker». Кликнуть по «Open Data» в окне «Start your project»



2. Нажать «Add» и загрузить нужные файлы

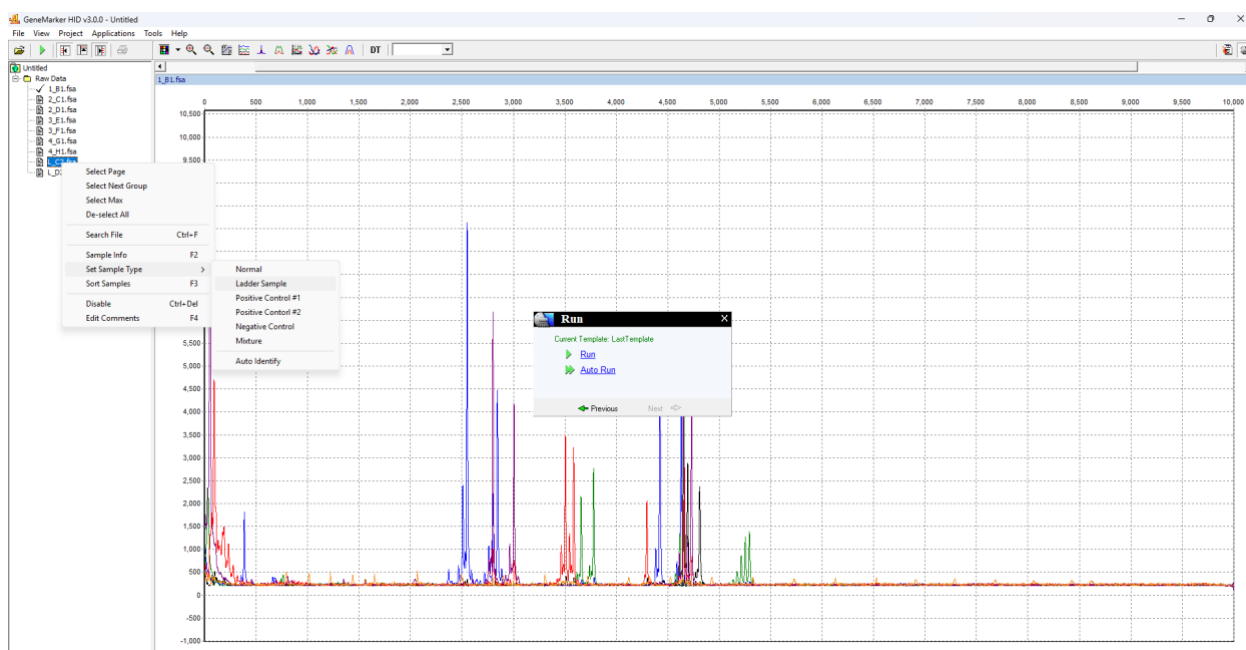


3. Нажать в левом нижнем углу «Dyes» и выбрать 6 каналов и «OK».

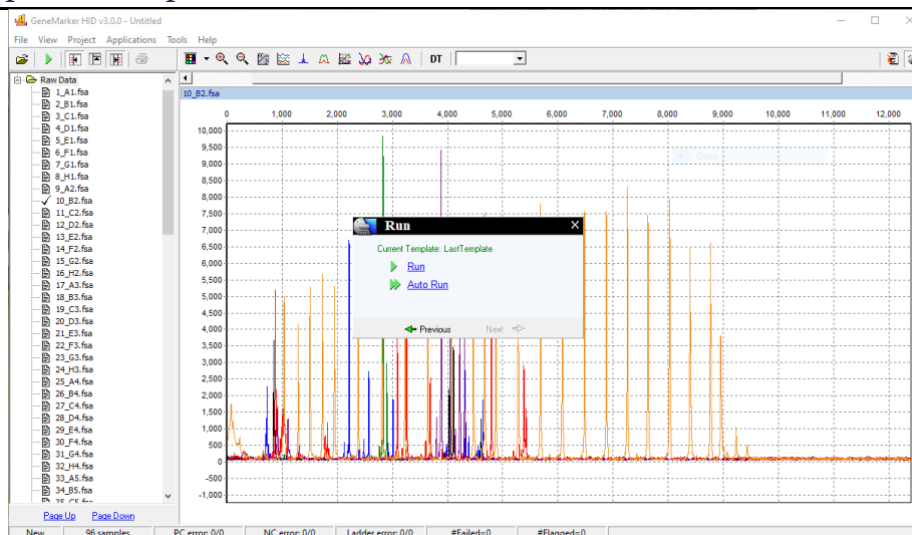


4. После добавления файлов нажать «ОК».

5. Назначить «Allelic Ladder», выбрав нужный образец из прогона и правой кнопкой мыши нажать «Set Sample Type» и затем «Ladder Sample».



6. Запустить анализ нажав на клавишу «Run».



7. В открывшемся окне «Run Wizard» выбрать «Select an existing template or create one» и в «Template Name» внести имя метода «GenExpert-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, specifically the 'Template Selection' step. The title is 'Run Wizard' and the subtitle is 'Template Selection'. Below the subtitle is the instruction 'Set the template of the project'. There are two radio buttons: 'Select an existing template or create one' (which is selected) and 'Use last template'. Under the selected radio button, there is a list of templates with checkboxes: GlobalFile, Identifier, Minifiler, PowerPlexFusion_6C, PowerPlexY23, PowerPlex_16, PowerPlex_18D, PowerPlex_21, and PowerPlex_FST_17. To the right of the list, there are four input fields: 'Template Name' (VITIS), 'Panel' (GE_VITIS_10), 'Size Standard' (450-320), and 'Standard Color' (Orange). At the bottom, there are five buttons: 'Save', 'Delete', '<< Back', 'Next >>', and 'Cancel'.

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

Run Wizard

Data Process - HID Analysis

Set data process options

Raw Data Analysis

☒ Auto Range (frame)
Start: 0 End: 10000

☒ Smooth ☐ Enhanced Smooth

Baseline Subtraction:
☒ Superior ☐ Classic ☐ Enhanced

☒ Pull-up Correction ☒ Spike Removal

☒ Saturation Detection ☒ Saturation Repair

Allele Call

☐ Auto Range (bps)
Start: 50 End: 610

Max Intensity: 32500

Peak Detection Threshold: ? ☐ Dye Specific

Min Intensity: 50

Percentage > 20 Global Max

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

Size Call

☒ Local Southern ☐ Cubic Spline

Save Delete << Back Next >> Cancel

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

Run Wizard

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

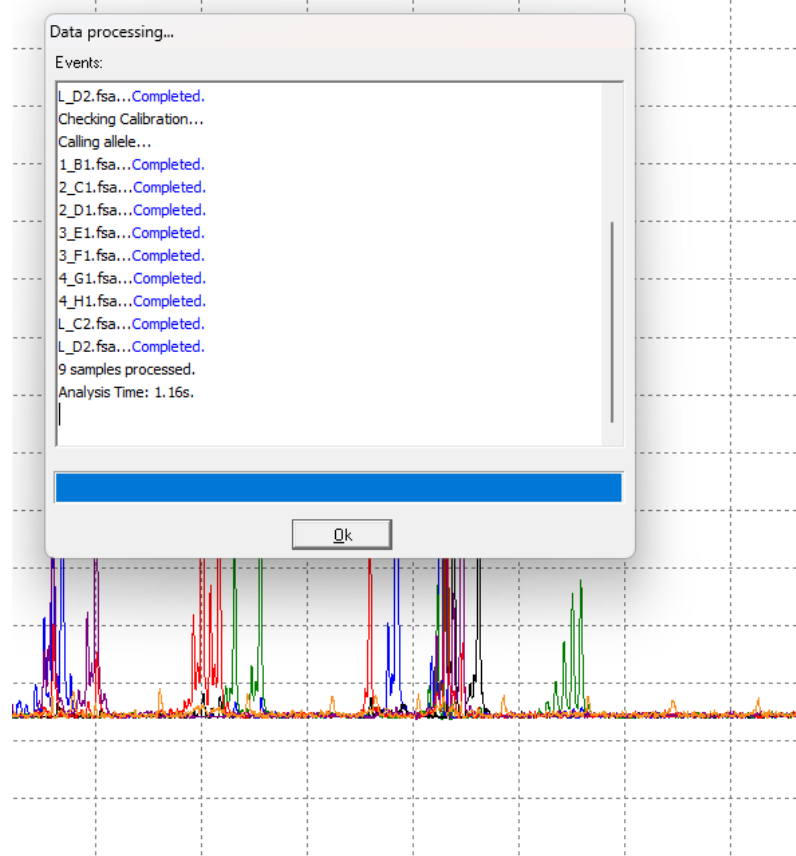
☐ Sample Quality Sensor

'Q' Allele: _____

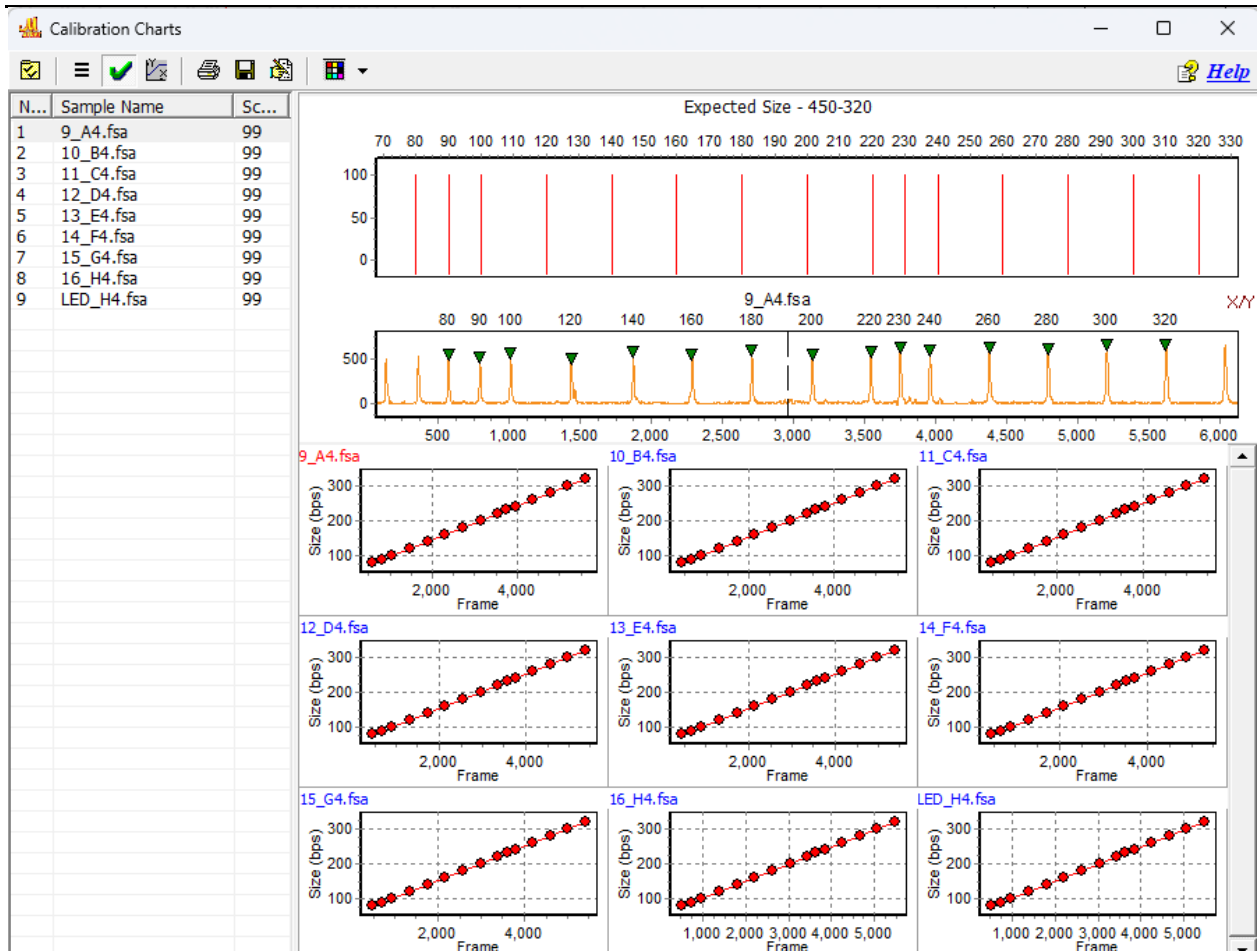
'S' Allele: _____

Save Delete << Back Ok Cancel

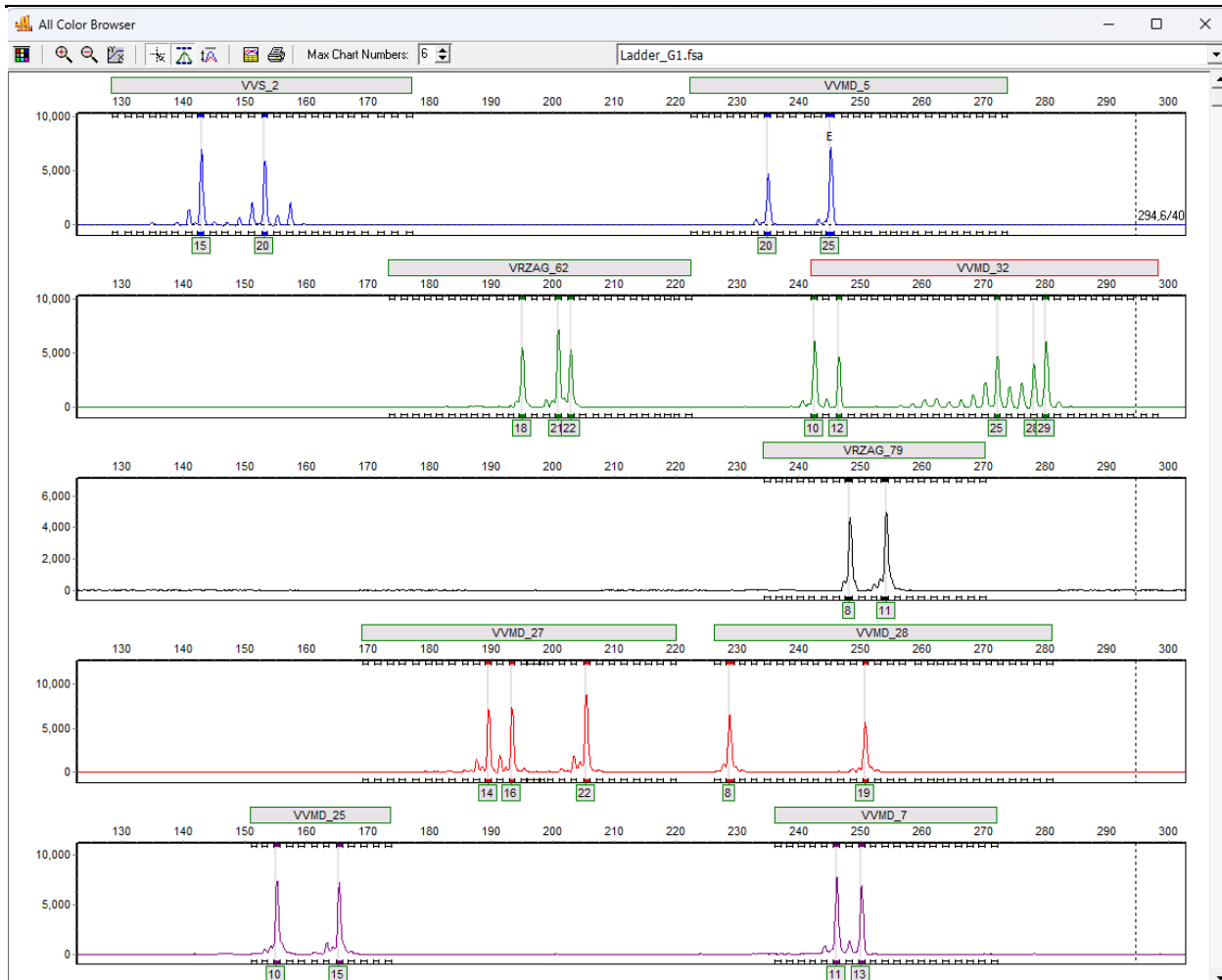
10. Идет анализ.



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

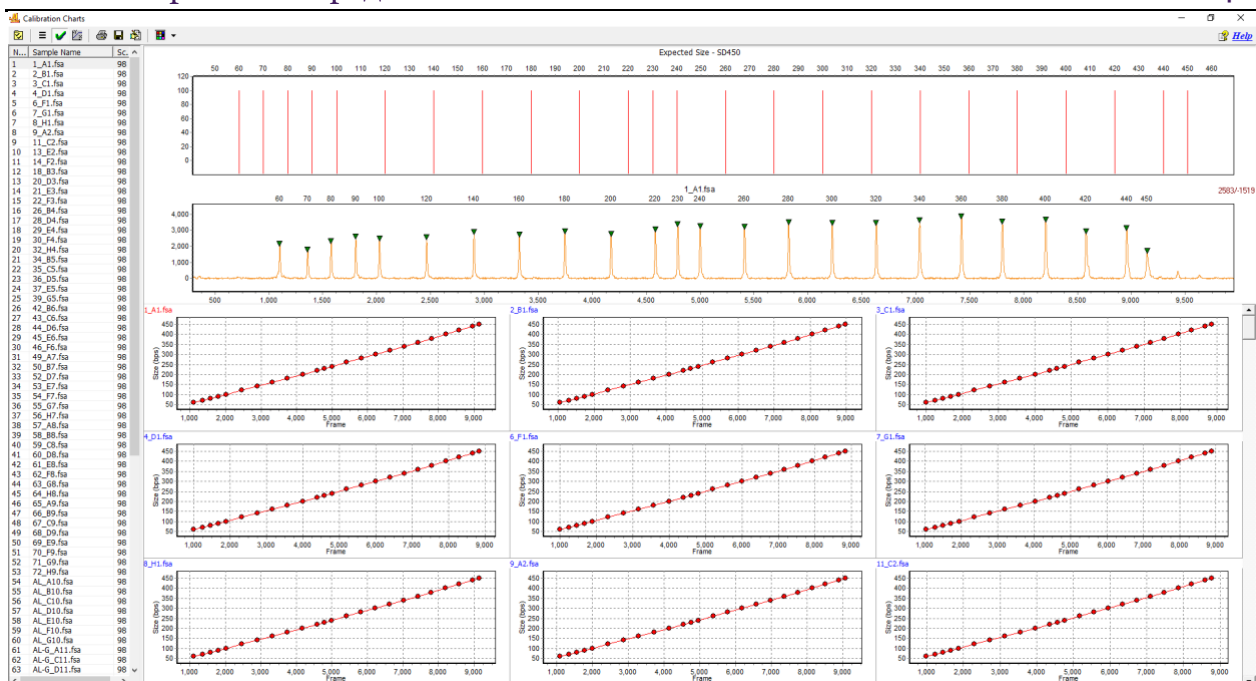


12. В окне «Browse by All Color» проверить расстановку Аллельной лестницы.



7.3 Размерный стандарт СД-450

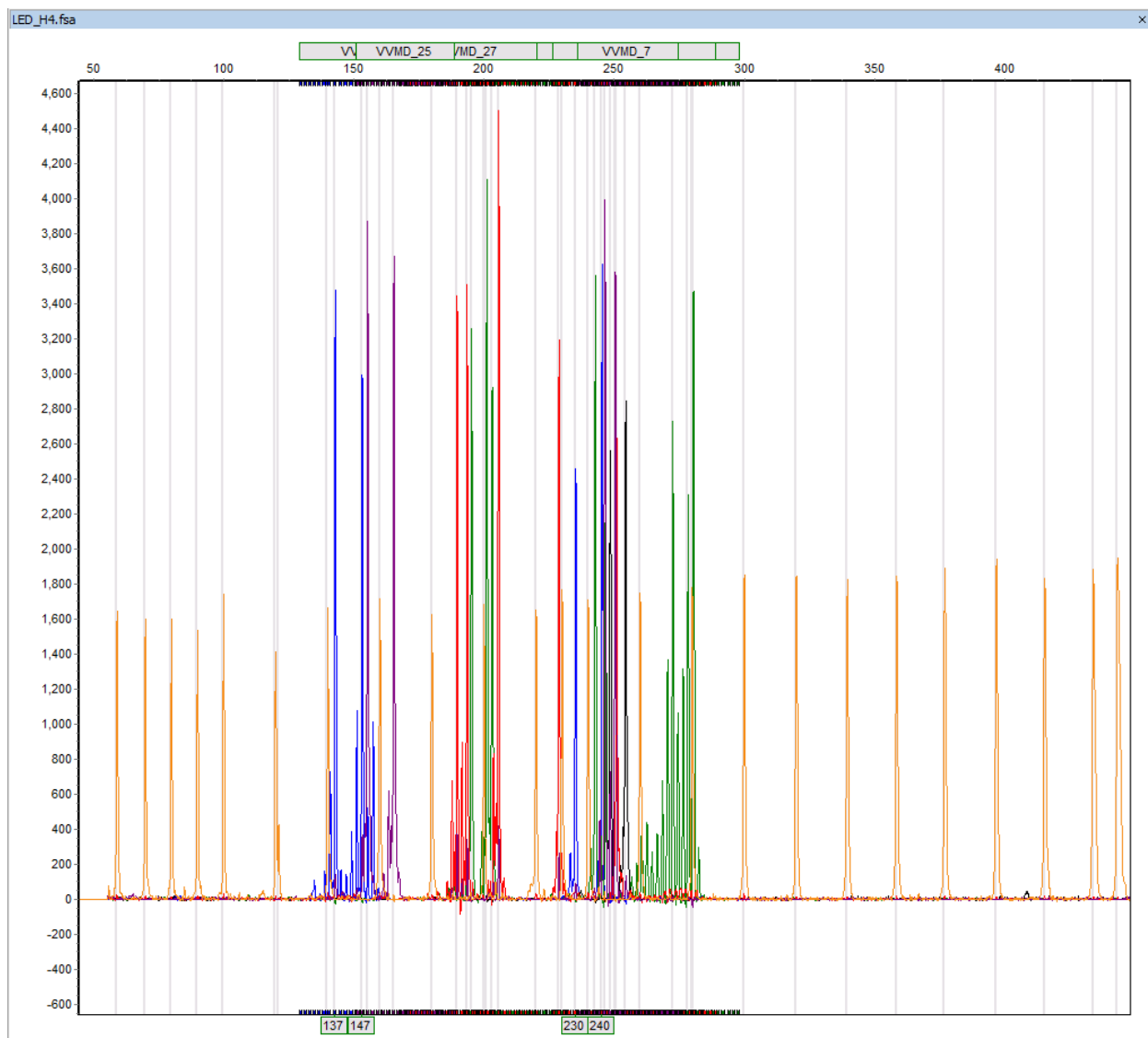
Ниже приводится пример электрофоретического разделения 24 фрагментов стандарта длины СД-450 в канале детекции SY660 (5-ый из 6-ти каналов детекции). Размеры фрагментов: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450.



7.4 Анализ аллельной лестницы

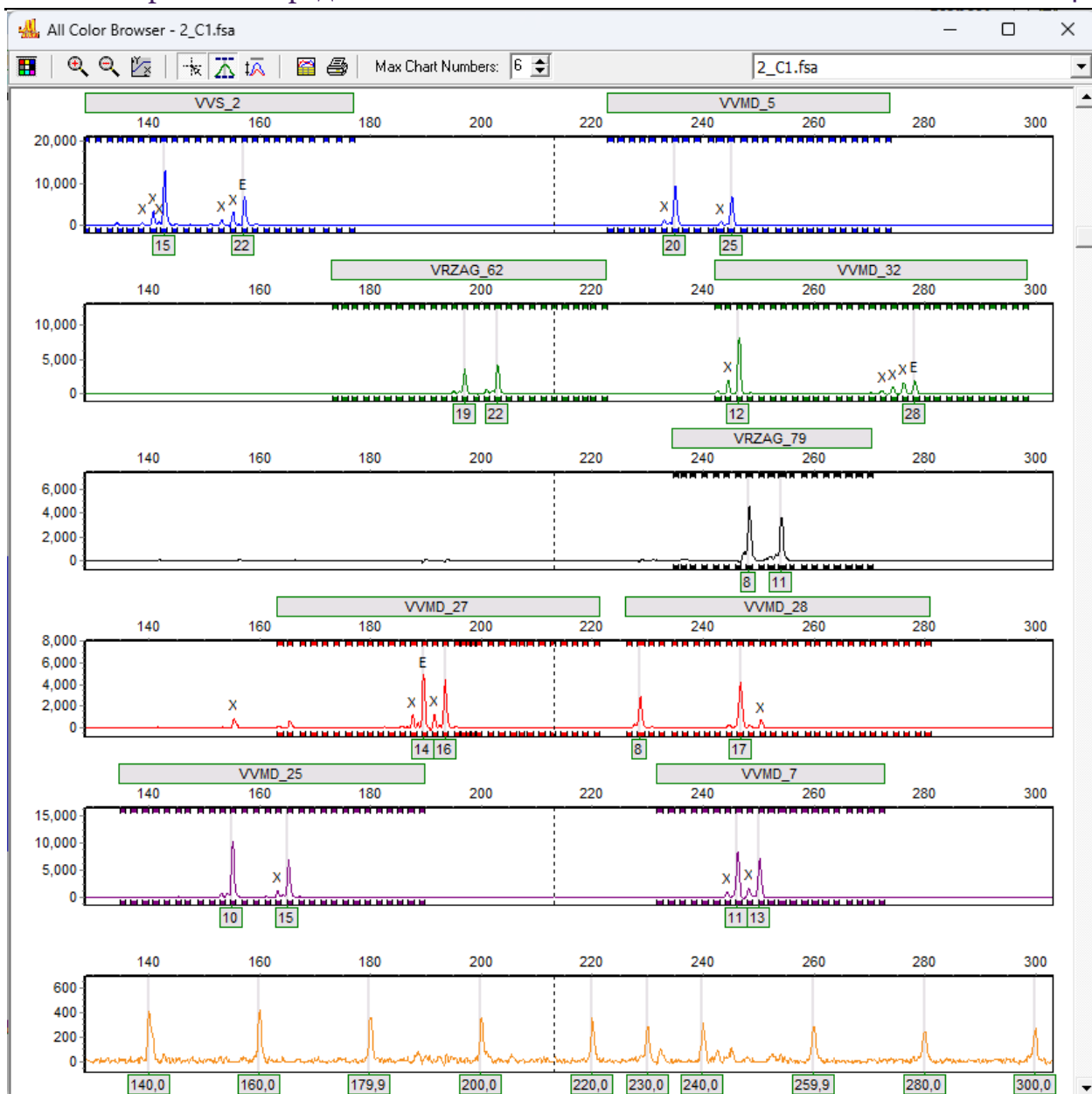
Ниже приводится расстановка электрофоретически разделенных 22 фрагментов **Аллельной лестницы** по 5 каналам детекции.

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 ПКО-ГЭ-В

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



Аллельное состояние положительного контрольного образца ПК-ГЭ-В



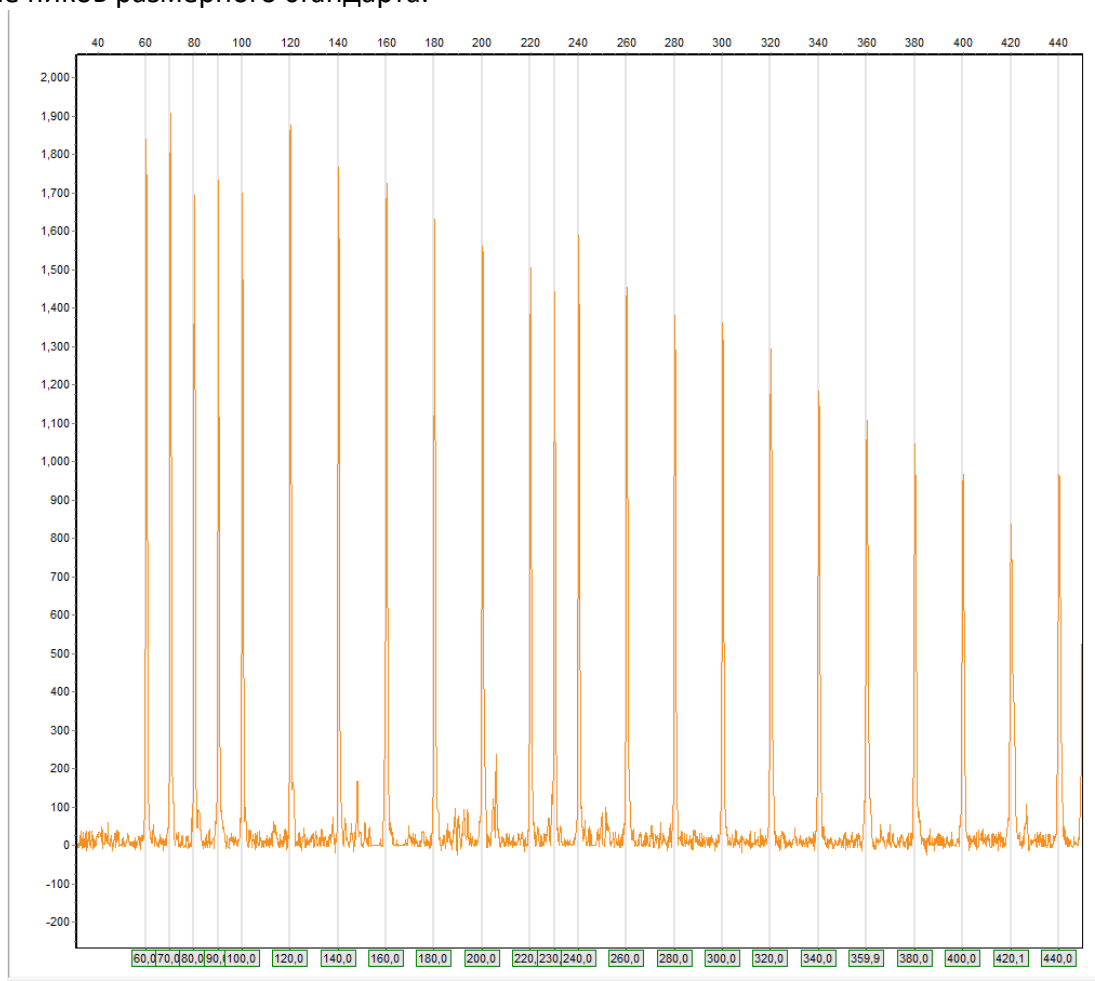
Аллельное состояние в пн положительного контрольного образца ПКО-ГЭ-В для анализа сорта по базе сортов.

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

7.5 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.



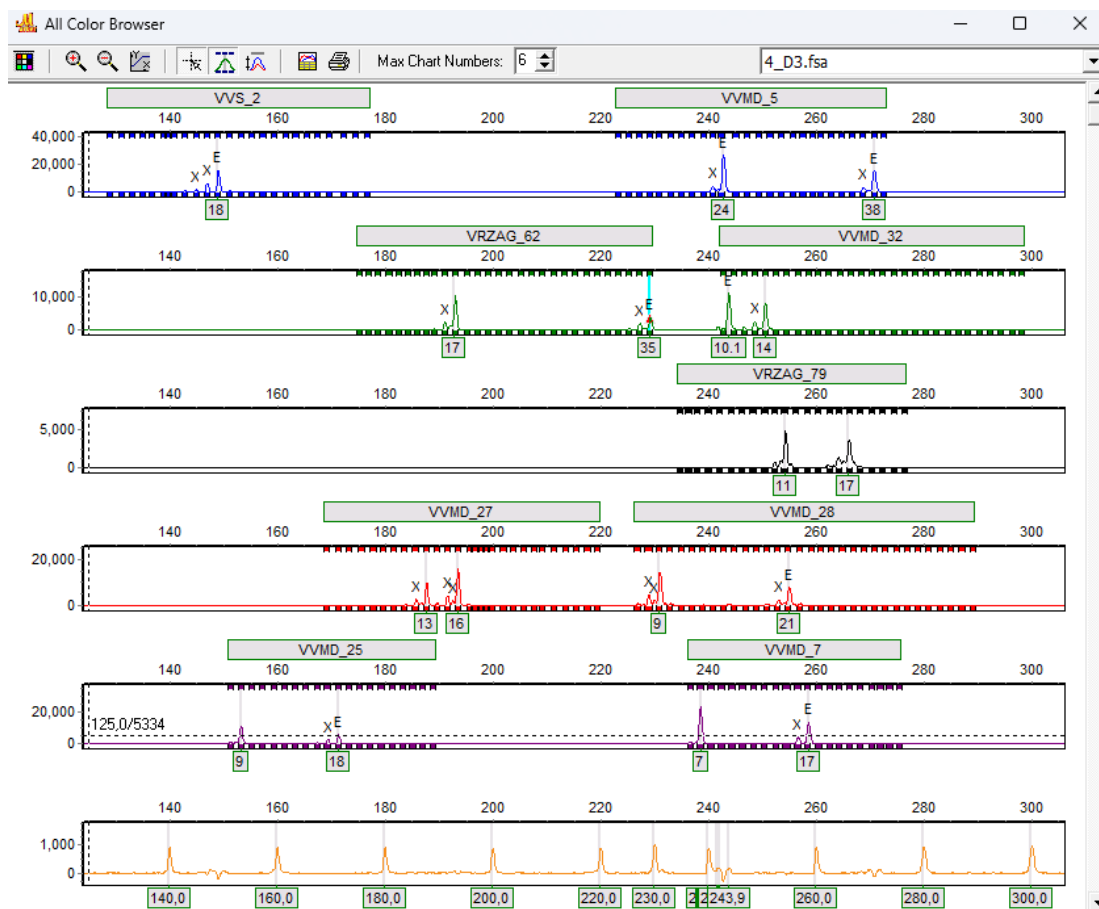
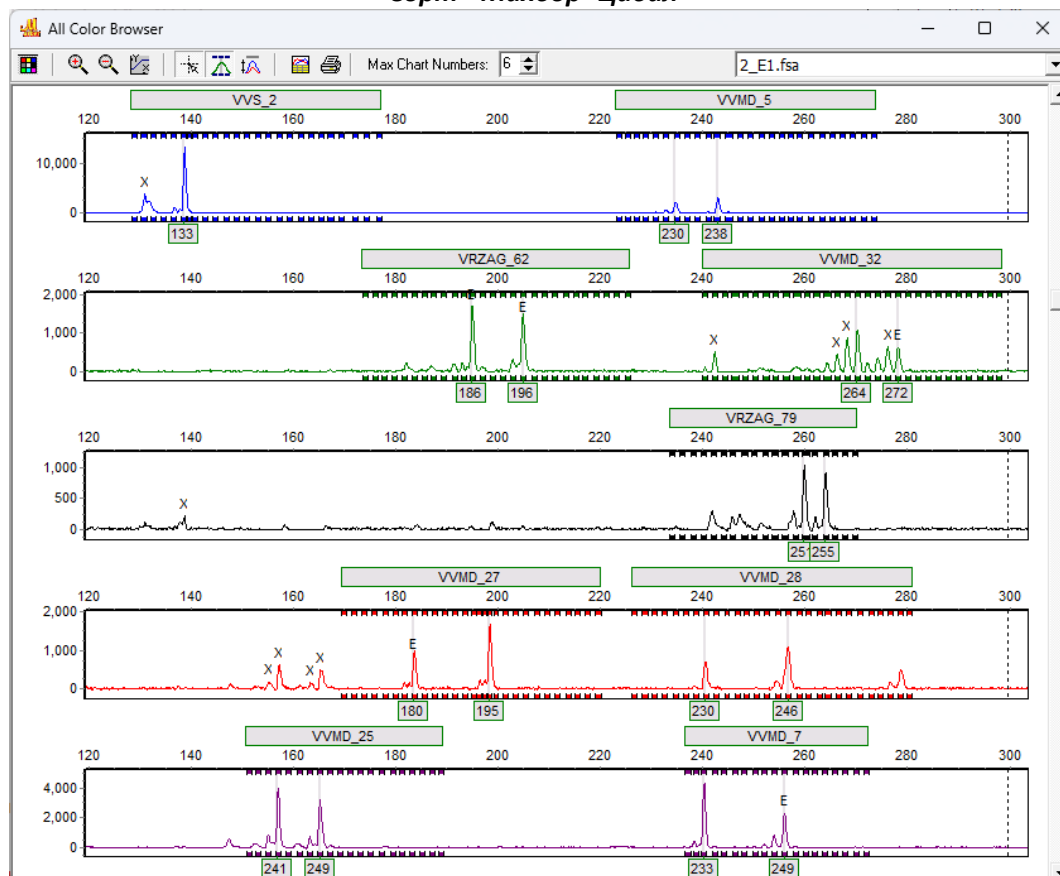
7.6 Анализ сорта образца

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		VMMD7	
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

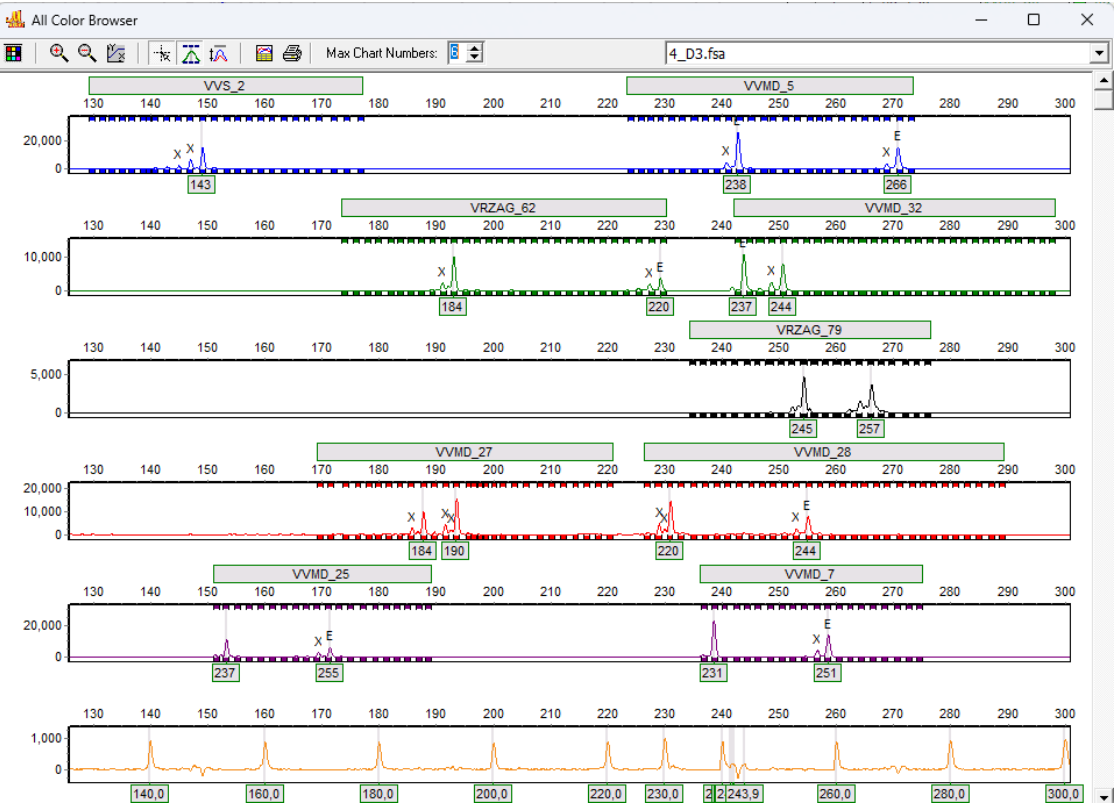
Сорт «Махбор- Цибил»



Fercal	VVS2	VVMD5	VRZAG62	VVMD32	VRZAG79	VVMD27	VVMD28	VVMD25	VVMD7
--------	------	-------	---------	--------	---------	--------	--------	--------	-------

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

Copm «Fercal»



8. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

ООО “Синтол”: www.syntol.ru

Техническая поддержка

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

Контакты: 127550, Москва, Тимирязевская 42,
Компания СИНТОЛ

Тел.:

++7 (495) 984-69-93 многоканальный

+7 (499) 977-74-55

+7 (495) 506-79-97

Факс.:

+7 (495) 984-69-93

+7 (499) 977-74-55

E-mail:

syntol@syntol.ru

info@syntol.ru

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