

"ГенЭксперт "Картофель"

Руководство Пользователя



Выделение ДНК



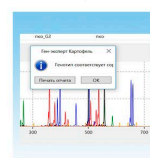
Оценка качества и
количества ДНК



Постановка ПЦР



Проведение
фрагментного
анализа



Автоматическое
определение
сорта по базе
генотипов
картофеля



Итоговый
протокол
исследования

Содержание

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ	3
1.1 Обоснование необходимости разработки и использования продукта	3
1.2 Описание набора	5
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	8
2. МЕТОДИКА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК	9
3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК	9
4. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ	9
4.1 Аллельная лестница	9
4.2 Положительный контрольный образец	9
5. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ	10
5.1 Подготовка к проведению реакции амплификации	10
5.2 Условия амплификации	10
6. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05	11
6.1 Проведение спектральной калибровки	11
6.2 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	12
6.3 Запуск фрагментного анализа	13
7. ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА АВ3500/АВ3500XL	13
7.1 Проведение спектральной калибровки	13
7.2 Создание DyeSets	14
7.3 Подготовка раствора спектрального калибратора	15
7.4 Запуск спектральной калибровки	15
7.5 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	16
7.6 Запуск фрагментного анализа	17
8. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «ГЕНЭКСПЕРТ «КАРТОФЕЛЬ»	17
8.1 Запуск анализа	17
8.2 Создание схемы анализа	20
8.3 Создание стандарта длины	24
8.4 Стандарт длины СД-450	25
8.5 Интерпретация результатов анализа	25
8.6 Формирование протокола исследования	33
9. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «GENEMARKER».	35
9.1 Импорт файлов для анализа данных	35
9.2 Создание проекта анализа данных	36
9.3 Размерный стандарт СД-450	41
9.4 Анализ аллельной лестницы	42
9.5 Анализ положительного контрольного образца (ПКО)	43
9.6 Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)	44
9.7 Анализ образца	44
10. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	46
11. ЛИТЕРАТУРА	47
ЗАМЕЧАНИЯ И ПОЖЕЛАНИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ	48

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

1.1 Обоснование необходимости разработки и использования продукта

Картофель – одна из важнейших сельскохозяйственных культур универсального применения. По данным Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) площади под картофелем в мире составляют более 19 млн. га. Урожайность картофеля в мире в среднем около 19 т/га, в России 14,8 т/га, при этом в Европе 31,2 т/га, в Германии 45,7 т/га, в Северной Америке 41 т/га, в США 44,7 т/га.

Картофелеводство – одна из ведущих отраслей сельского хозяйства. В мировом производстве среди пищевых сельскохозяйственных культур картофель занимает четвёртое место, уступая пшенице, кукурузе и рису (Карманов С.Н., 1981). Анализ мирового рынка показывает, что валовое производство картофеля в сельскохозяйственных предприятиях достаточно не стабильно. С каждым годом численность населения растёт, для удовлетворения его потребностей необходимо увеличить объём продовольственного и сельскохозяйственного производства. Это необходимо осуществлять с минимальными затратами труда и влиянием на окружающую среду, и с максимальным уровнем чистого дохода и рентабельности (Анисимов Б.В., 1998). Данная цель должна быть достигнута при выращивании картофеля, т.к. он играет важную роль в жизнеобеспечении каждого человека.

Картофель – одна из ведущих культур в агропромышленном секторе по объёму производимой продукции. Россия – не только производитель, но и крупный импортер продовольственного и семенного картофеля. Причем некоторые страны, откуда ввозится картофель, в нашем традиционном представлении о биологии данной культуры не самые благоприятные для его выращивания по комплексу почвенно-климатических факторов.

Современное производство картофеля заданного сорта представляет собой важную задачу, при решении которой необходимо учитывать множество факторов. Одним из них является семенной материал, от качества которого напрямую зависит эффективность производства и прибыль в целом.

Для ведения семеноводства картофеля на современном технологическом уровне, необходимо уметь контролировать сортовую принадлежность и чистоту семенного материала. В настоящее время «золотым стандартом» идентификации сортов картофеля является генетический анализ полиморфизма микросателлитных последовательностей ДНК картофеля (О.Ю. Антонова, 2016). Результатом генетической идентификации является получение ДНК паспорта сорта картофеля, использование которого позволяет защитить интеллектуальную собственность селекционеров, а также контролировать качество закупаемого семенного материала производителями и исключать его фальсификацию.

Набор «ГенЭксперт «Картофель»» предназначен для испытательных лабораторий Госсортокомиссии, Россельхозцентров, Межобластных ветеринарных лабораторий Россельхознадзора, Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, научно-исследовательских организаций, занимающихся селекцией и семеноводством картофеля и других государственных и частных испытательных лабораторий и научно-исследовательских организаций.

**ОБЩЕЕ ВРЕМЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ОТ 1 ДО 8 ОБРАЗЦОВ
СОСТАВЛЯЕТ 4,5 ЧАСА**

№	Образец	ST10000	ST10001	ST10002	ST10003	ST10004	ST10005	ST10006	ST10007	ST10008	ST10009	ST10010	ST10011	ST10012
1	Сорт	100-001	100-002	100-003	100-004	100-005	100-006	100-007	100-008	100-009	100-010	100-011	100-012	
2	Сорт	100-013	100-014	100-015	100-016	100-017	100-018	100-019	100-020	100-021	100-022	100-023	100-024	

Автоматическое определение сорта по базе генотипов картофеля и печать итогового протокола исследования

"ГенЭксперт" "Картофель"

7 - Анализ данных с помощью программного обеспечения "ГенЭксперт" "Картофель" (1 мин)

6 - Проведение капиллярного гель-электрофореза (40 мин-8 образцов)

5 - Постановка ПЦР (50 мин)

4 - набор "ГенЭксперт" "Картофель". Разведение сухих готовых смесей для проведения ПЦР (5 мин)

3 - Оценка качества и количества ДНК (15 мин)

2 - Выделение ДНК. Набор СОРБ-ГМО-Б (150 мин)

1 - Гомогенизация (15 мин)

1.2 Описание набора

ГенЭксперт-Картофель - набор реагентов для ДНК паспортизации сортов картофеля на основе мультиплексного ПЦР-анализа 12 микросателлитных локусов, содержащих короткие tandemные повторы (Short Tandem Repeat) или STR-локусов.

12 STR-локусов: STG 0016, STI 0001, STM 5127, STI 0004, STI 0046, STI 0032, STI 0012, STI 0013, STI 0030, STI 0033, STI 0014, STM 5114 выбраны, исходя из показанной для них высокой информативности (О.Ю. Антонова, 2016; Marc Ghislain, 2009; Agim Ballvora, 2011; S. Feingold, 2005 Vishakha Sharma, 2014; О.С. Колобова, 2017).

Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 12 STR-локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов находится в диапазоне 70-330 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 пять флуоресцентных красителей, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременного детектирования в разных каналах флуоресценции. Праймеры содержат четыре флуоресцентных красителя, детектируемых в каналах 6R110¹, 6R6G², 6TAMRA³, 6ROX⁴. Фрагменты стандарта длины СД-450 мечены пятым флуоресцентным красителем Sy660 и детектируются в канале LIZ одновременно с продуктами ПЦР.

Для получения полного (по всем 12-ти локусам) генотипа образца достаточно 2 нанограмма (нг) не деградированной ДНК. Оптимальное количество ДНК в реакцию — 10 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 10 мкл. Благодаря высокой устойчивости реакционной смеси к действию ингибиторов, большой объем препарата ДНК не мешает успешной амплификации.

Набор ГенЭксперт-Картофель может использоваться для создания баз данных с ДНК паспортами сортов и сортообразцов картофеля.

Программное обеспечение «ГенЭксперт «Картофель», позволяет проводить анализ полученных данных и автоматическое определение сорта картофеля, путем сравнения с ДНК паспортами сортов из базы данных. Создана и постоянно расширяется база данных ДНК паспортов сортов картофеля, производимых на территории Российской Федерации, как отечественных, так и иностранных оригинаторов. База насчитывает ДНК паспорта более 100 сортов.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах: АНК 32/48, GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, CFX BioRad, T100 BioRad, 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-Картофель представлена в таблице 1.

¹ С переносом энергии флуоресценции 5' 6Аlexa -6R110 -праймер 3'

² С переносом энергии флуоресценции 5' 6Аlexa -6R6G-праймер 3'

³ С переносом энергии флуоресценции 5' 6Аlexa -6TAMRA -праймер 3'

⁴ С переносом энергии флуоресценции 5' 6Аlexa -6ROX -праймер 3'

Структура единицы повтора приводится в соответствии с данными секвенирования.

Таблица 1. Описание STR-локусов набора ГенЭксперт-Картофель.

№	Локус	Краситель	Длина	Повтор	Хромосома
1	STG0016	6a-R110	129-174	(AGA) _n	I
2	STI0001	6a-R110	179-205	(AAT) _n	IV
3	STM5127	6a-R110	233-275	(CTT) _n	I
4	STI0004	6a-R6G	72-116	(AAG) _n	VI
5	STI0046	6a-R6G	173-236	(GAT) _n	XI
6	STI0032	6a-TAMRA	63-97	(GGA) _n	V
7	STI0012	6a-TAMRA	164-206	(ATT) _n	IV
8	STI0013	6a-TAMRA	255-314	(ACC) _n	III
9	STI0030	6a-ROX	84-119	(AAT) _n	XII
10	STI0033	6a-ROX	124-157	(AGG) _n	VII
11	STI0014	6a-ROX	166-196	(TGG) _n (AGG) _n	IX
12	STM5114	6a-ROX	290-322	(CAC) _n	II

Набор ГенЭксперт-Картофель 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-Картофель	48	ГЭ-К-48

1.3 Компоненты набора и состав

№	Компонент	Количество
1	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ГЭ-К-48, 0.2 мл.	6 стрипов по 8 микропробирок
2	Раствор активатора, 0.8 мл.	2 пробирки
3	Положительный контрольный образец, ПКО, 20 реакций	1 пробирка
4	Аллельная лестница, 20 нанесений	1 пробирка
5	Стандарт длины, СД-450, 120 мкл	1 пробирка
6	Спектральный калибратор 6a-СК-5, 120 нанесений	1 пробирка
	Деионизированная вода, dd H ₂ O, 1.7 мл	2 пробирки
	Бины и панели для программы «ГенЭксперт «Картофель» (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 Mg^{2+} 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.

Аллельная лестница представляет собой лиофилизированную смесь из 52 флуоресцентно-меченных амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующих аллельным вариантам исследуемых локусов. Аллельная лестница используется на этапе капиллярного электрофореза, анализируется параллельно с каждой серией образцов для идентификации аллельных вариантов исследуемых локусов. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует разведения водой. Аллельная лестница содержит ПЦР-продукты и при несоблюдении мер предосторожности может быть источником контаминации остальных реагентов. Сразу после получения набора рекомендуется извлечь аллельную лестницу из общей упаковки и хранить отдельно от остальных компонентов в темноте в зоне для работы с ПЦР-продуктами.

1.4 Необходимые материалы, не входящие в набор и дополнительное оборудование

Реагент	Производитель	Каталожный номер
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
Штатив для микропробирок 1,5 мл «РМ-96х1,5 /2,0»	ООО «НПФ Синтол»	кат. № СТ-17
Стрипы с крышками 0,2 мл.	ООО «НПФ Синтол»	
Штатив для 96-ти луночных ПЦР планшет или стрипов. «ПЦР-96».	ООО «НПФ Синтол»	кат. № СТ-12
Дозатор переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.		

Наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 и 10 мкл.		
96-ти луночные ПЦР планшеты или микропробирки в стрипах для ПЦР.		
Пленка для 96-ти луночных ПЦР планшет или крышки к микропробиркам в стрипах.		
Центрифуга-вортекс для пробирок объемом 1,5 или 2 мл	ООО «НПФ Синтол»	Циклотемп-901
Микроцентрифуга для стрипов	ООО «НПФ Синтол»	Циклотемп-903
Прибор для ПЦР/ПЦР-РВ	ООО «НПФ Синтол»	АНК-32/48

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-5 транспортируются при -20 °C.

Сразу после получения набора рекомендуется хранить его в темноте при температуре 2...8°C.

Для более длительного хранения аллельной лестницы и положительного контрольного образца рекомендуется заморозка при -20°C.

Спектральный калибратор ба-СК-5 и размерный стандарт СД-450 хранить при -20°C.

1.6 Основные характеристики набора

Количество одновременно анализируемых маркеров — 12.

Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 5.

Оптимальное количество вносимой ДНК – 2-10 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 «Картофель», просим незамедлительно связаться с компанией «СИНТОЛ». Контактная информация указана в главе 10.

2. МЕТОДИКА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

Для анализа рекомендуется брать по 6 индивидуальных образцов (клубней/листьев/пробирочных растений). Во избежание ложного ответа при анализе (смесевой образец), необходимо производить точечный отбор образцов.

Клубень

Картофель из мешков или ящиков, отобранных для анализа, высыпают на чистую площадку или брезент. Отбор точечных проб от образовавшейся насыпи проводят аналогично.

Лист

С посевов картофеля следует брать пробы по диагонали. Рекомендуется отбирать не менее 6 точечных проб. Точечной пробой служит листовая пластина растения (одна проба - один лист). Лист растения срезают острым ножом или ножницами, не засоряя почвой, и 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 («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 Аллельная лестница

Сразу после получения набора, пробирку с аллельной лестницей необходимо извлечь из коробки и хранить отдельно в зоне для работы с ПЦР-продуктами в темном месте. Для получения рабочего раствора добавить в пробирку с сухой аллельной лестницей 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.

4.2 Положительный контрольный образец

Сразу после получения набора, пробирку с ПКО необходимо извлечь из коробки и хранить отдельно в зоне для работы с ПЦР-продуктами в темном месте. Для получения рабочего раствора

добавить в пробирку с сухим ПКО 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).

5. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИЯ

5.1 Подготовка к проведению реакции амплификации

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

В каждую пробирку сухого набора внести:

Компоненты набора	Объем на 1 образец, мкл
Сухая реакционная смесь	
Раствор активатора	15
Геномная ДНК (1-10 нг) или ПКО	1
Деионизированная вода, до конечного объема 25 мкл	9

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

Внести в подготовленные пробирки по 1 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 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 контрольной ДНК, поставляемой с набором), один отрицательный контроль (деионизированная вода).

5.2 Условия амплификации

Приведенные ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных параметров. Важно соблюдение скорости нагрева 0,3 С/с. на этапе повышения температуры с 60°C до 72°C. В связи с высокой сложностью амплификации с участием 12 пар праймеров, данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции.

Ниже приводятся примеры программ, подобранных для приборов АНК 32/48, GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, CFX BioRad, T100 BioRad, 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 °С	3 мин	1
95 °С	10 сек	35
60 °С	40 сек	
72 °С*	5 мин	1
4 °С	10 мин	1

При работе с малыми количествами ДНК (<1 нг ДНК) можно увеличить количество циклов ПЦР. Не рекомендуется превышать 40 циклов. В этом случае возрастает опасность ошибки вследствие выпадения аллелей и дисбаланса гетерозигот.

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

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-Картофель**.

Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 5-ти цветным калибратором **ба-СК-5** (ООО «Синтол»).

При работе с генетическим анализатором НАНОФОР 05, и последующем анализе данных в программе ГенЭксперт-Картофель, необходимо следовать Руководству пользователя НАНОФОР 05.

6.1 Проведение спектральной калибровки

Важно! Спектральная калибровка проводится после замены или установки линейки капилляров, используемых для анализа образцов.

Спектральный калибратор содержит смесь из 5 фрагментов ДНК разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями (6Аlexa-6R110, 6Аlexa-6R6G, 6Аlexa-6TAMRA, 6Аlexa-6ROX, 6Аlexa-Sy660). Эти красители использованы в наборе ГенЭксперт-Картофель (FAM, R6G, TAMRA, ROX) 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 ба-СК-5**, перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
2. Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки одного ряда 96-луночного планшета (возможно нанесение в любой ряд планшета) или в стрипованные микропробирки. При необходимости удалить пузыри со дна лунок (пробирок) кратким центрифугированием.
3. Поместить в термоциклер с открытой крышкой.

▪ Условия денатурации:

1. 95 °С – 5 мин
2. 4 °С – 5 мин

Центрифугировать 2 мин.

4. Установить 96-луночный планшет или стрипованные микропробирки в прибор для капиллярного электрофореза.

5. Провести калибровку по стандартному протоколу **спектральной калибровки**.

Краситель	Цвет	Порядковый номер пика
6Alexa-6R110	Синий	5
6Alexa-6R6G	Зеленый	4
6Alexa-6TAMRA	Черный	3
6Alexa-6ROX	Красный	2
6Alexa-Sy660 (с.д.)	Желтый	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]	5	5	5	5
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 форезе [сек]	15	15	15	15
Напр. шага высокого при форезе [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 фореза	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

6.2 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, например 10⁻¹.

2. Приготовить смесь Ди-формаида и размерного стандарта СД-450 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну микропробирку, мкл
Ди-формаид	9
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.

Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.

Добавить по 10 мкл смеси в каждую микропробирку плашки/стрипа.

Внести в смесь по 1 мкл ПЦР-продукта.

В отдельную лунку внести 1 мкл раствора аллельной лестницы.

Закрывать микропробирки плашки/стрипа.

Перемешать на вортке и кратковременно центрифугировать для сброса капель.

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-формаида.

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

6.3 Запуск фрагментного анализа

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе проводится в соответствии с Руководством пользователя, предоставляемым производителем. Рекомендуемые параметры электрофореза в зависимости от длины капилляров и типа полимера представлены в таблице:

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]	3	3	3	3
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 форефе [сек]	15	15	15	15
Напр. шага высокого при форефе [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 форефе	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.

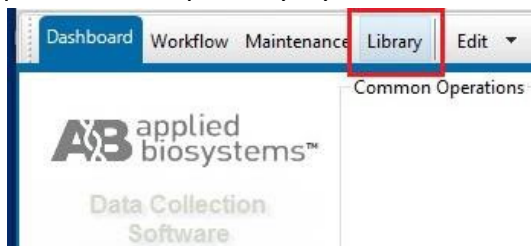
7.ПРОВЕДЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА АВ3500/АВ3500ХЛ

7.1 Проведение спектральной калибровки

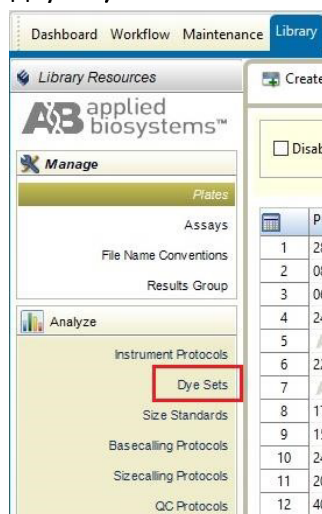
Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 6-ти цветным калибратором **6а-СК-5** (ООО «Синтол»).

7.2 Создание DyeSets

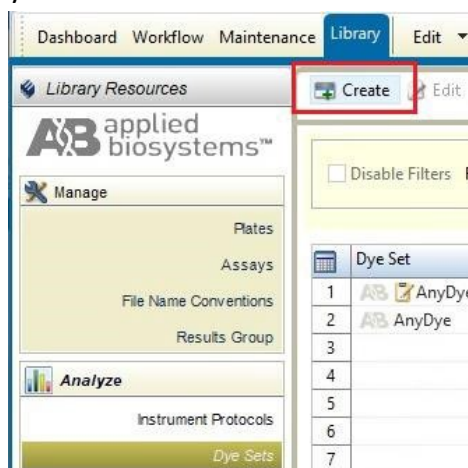
1. Открыть программу Data Collection Software
2. Кликнуть по иконке «Library» в левом верхнем углу окна.



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



4. В верхней части нажать кнопку «Create»



5. В открывшемся окне в поле «Dye Set Name» написать **6a-CK-5**, в поле «Chemistry» из выпадающего списка выбрать «Matrix Standard», а в поле «Dye Set Template» из выпадающего списка выбрать «AnyDye Template».

- В таблице «Arrange Dyes» установить последовательность пиков, на вкладке «Parameters» установить диапазон пиков и время электрофореза.

ПРИМЕЧАНИЕ! Время электрофореза «Limit Scans To» зависит от длины капилляров и типа полимера.

- Нажать кнопку «Save», для сохранения Dye Set **6a-CK-5**.

7.3 Подготовка раствора спектрального калибратора

- В отдельной пробирке смешать Ди-формамид и раствор **6a-CK-5** по протоколу:

	AB3500	AB3500XL
Ди-формамид	80 мкл	240 мкл
6a-CK-5	4 мкл	12 мкл

- Перемешать смесь на вортексе и центрифугировать для сброса капель.
- Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки:

ПРИМЕЧАНИЕ! В случае 24-х капиллярного генетического анализатора – внести раствор в три ряда 96-луночного планшета (возможно внесение в 1-3, 4-6, 7-9, 10-12 ряды планшета) или в стрипованные пробирки.

В случае 8-ми капиллярного генетического анализатора - внести раствор в ряд 96-луночного планшета или в стрипованные пробирки

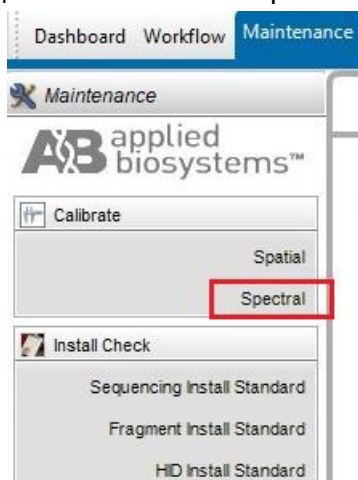
- Установить 96-ти луночный планшет или стрипованные пробирки, с раствором калибратора CK-5, в прибор для капиллярного электрофореза.

7.4 Запуск спектральной калибровки

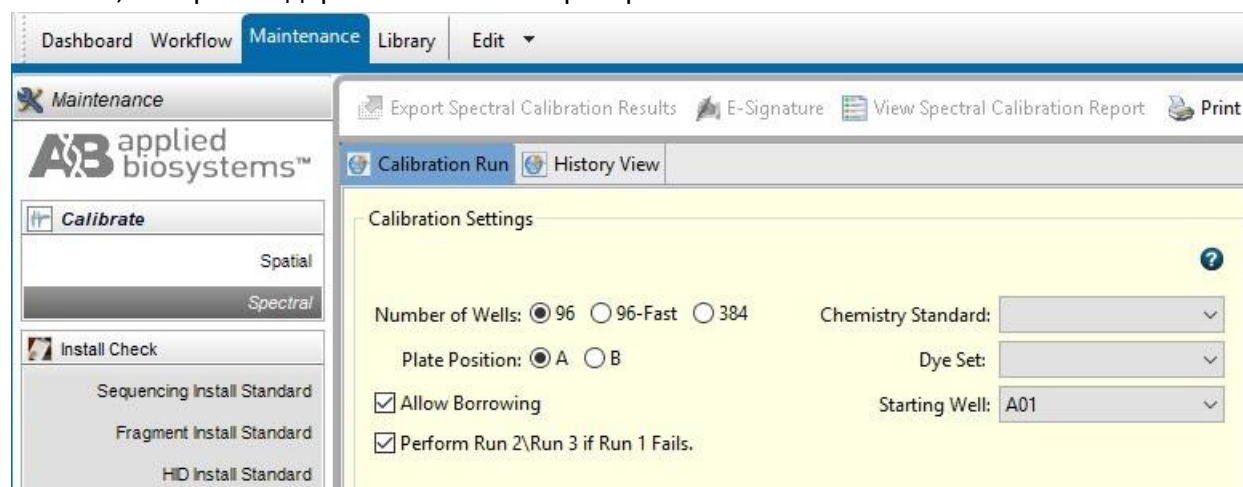
- Открыть программу Data Collection Software. Кликнуть по клавише «Maintenance» в верхней строке или «Wizard».



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



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



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

7.5 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

1. Приготовить смесь HiDi-формамида и размерного стандарта СД-450 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на одну лунку, мкл
HiDi-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.

2. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
3. Добавить по 10 мкл смеси в каждую лунку плашки/стрипа.
4. Внести в смесь по 1 мкл ПЦР-продукта.
5. В отдельную лунку внести 1 мкл раствора аллельной лестницы.
6. Закрыть плашку/стрип.
7. Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать для сброса капель.
8. Денатурировать образцы 5 мин при 95°C.

ВАЖНО! Нанесение образцов происходит из восьми (AB3500) или двадцати четырех (AB3500 XL) лунок ряда одновременно. Не допускается запуск прибора, если в анализируемом ряду имеется хотя бы одна незаполненная лунка! В пустые лунки, не содержащие образцы, следует внести по 10 мкл воды или формамида.

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

7.6 Запуск фрагментного анализа

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе проводится в соответствии с руководством пользователя, предоставляемым производителем. Рекомендуемые параметры электрофореза:

Параметры	Рекомендуемое значение
Injection Voltage, [kVolts]	3
Injection Time, [sec.]	5
Run Voltage, [kVolts]	12.2

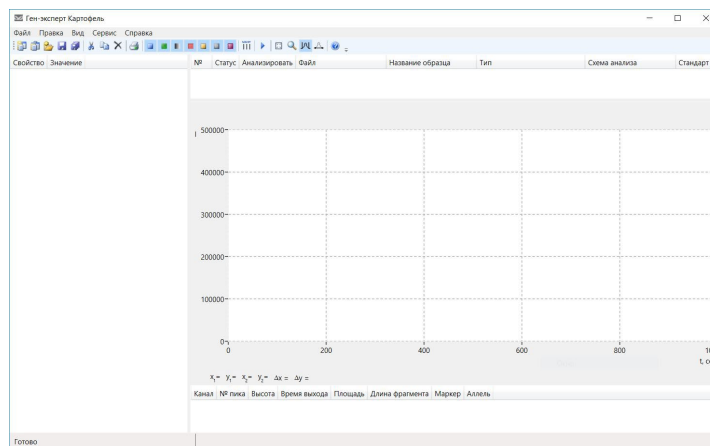
Время электрофореза - «**Run Time**» и время исключения регистрации электрофореза - «**Data Delay**», зависит от типа полимера и длины капилляров и настраивается пользователем в зависимости от используемой комбинации капилляров и полимера.

8. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «ГенЭксперт «Картофель»»

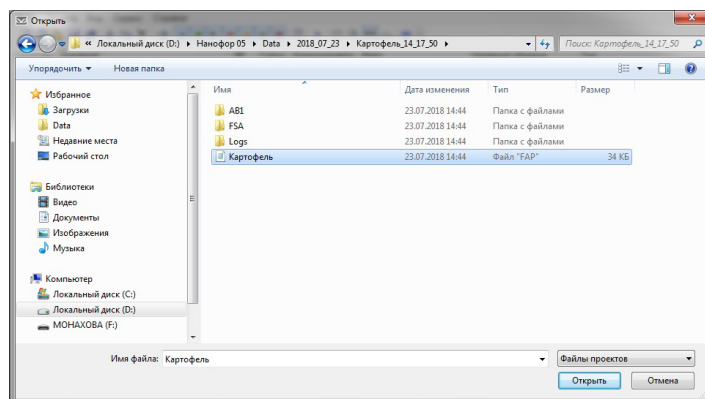
После завершения программы измерений, данные следует проанализировать. Анализ данных проводится с помощью программы «ГенЭксперт «Картофель»».

8.1 Запуск анализа

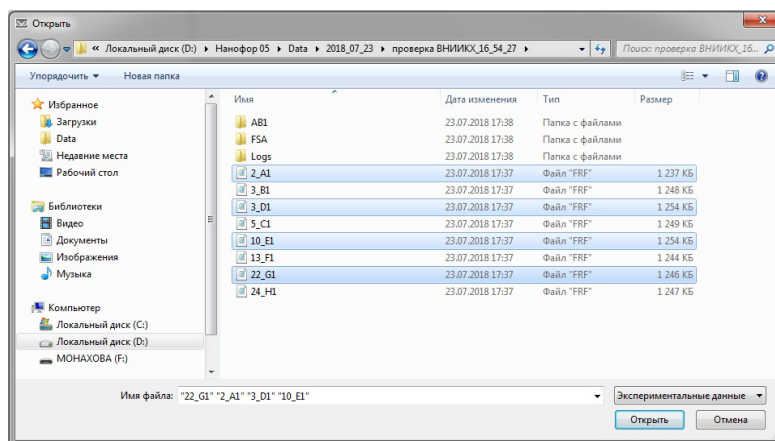
Запустить программу «ГенЭксперт «Картофель»». Откроется Основное окно программы.



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 ). 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 ). В открывшемся окне отметить нужные файлы и нажать **Открыть**. К текущему проекту добавятся только они. Программа «ГенЭксперт «Картофель» 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 ).



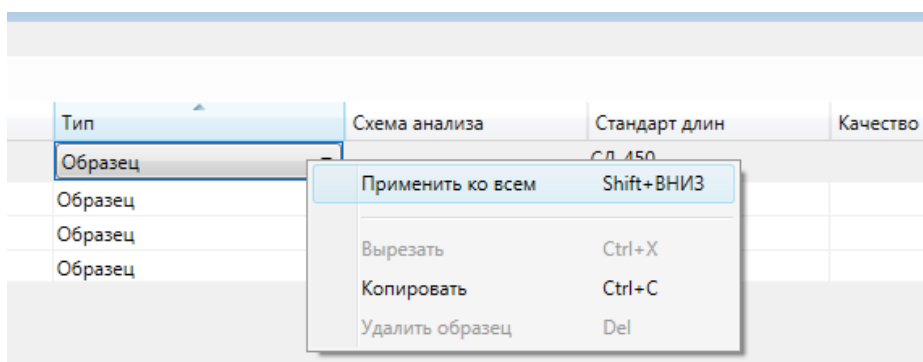
Перед проведением анализа необходимо убедиться, что для каждого образца заданы все необходимые параметры, а именно, **Тип**, **Схема анализа**, **Стандарт длин**. Как правило, все эти параметры уже введены в программе **Нанофор 05** при описании плашки.

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.

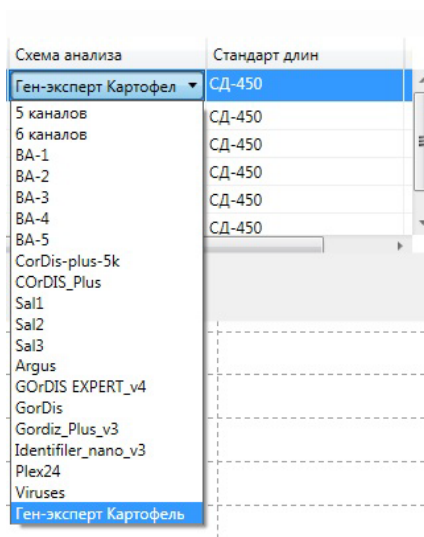
№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин
1	Готов к анализу	☒	1_A10	1	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450
2	Готов к анализу	☒	2_A1	2	Нет	Ген-эксперт Картофель	СД-450
3	Готов к анализу	☒	3_B1	3	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450
4	Готов к анализу	☒	5_C1	5	Положительный контроль	Ген-эксперт Картофель	СД-450
5	Готов к анализу	☒	6_D1	6	Отрицательный контроль	Ген-эксперт Картофель	СД-450
6	Готов к анализу	☒	7_E1	7	Аллельная лестница	Ген-эксперт Картофель	СД-450

Для того, чтобы применить выбранный параметр ко всем ячейкам столбца (т.е. 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).



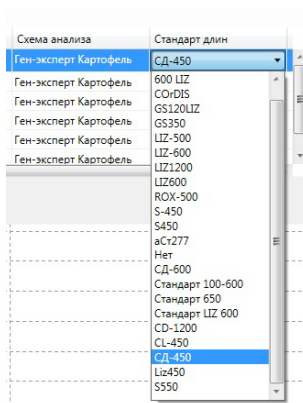
ВАЖНО! Среди всех анализируемых образцов хотя бы один образец должен быть с типом Аллельная лестница.

В графе Схема анализа выбрать «ГенЭксперт «Картофель»».



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.



В случае, если необходимый стандарт длины отсутствует в списке, выполните действия, описанные в [пункте 8.3](#), чтобы его создать.

В графе Анализировать отметить символом ☒ каждый образец, для которого требуется провести анализ.

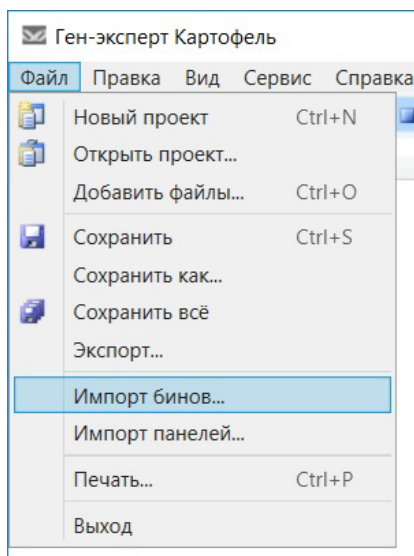
Нажать кнопку ▶ Запустить анализ, которая находится на панели инструментов основного окна программы «ГенЭксперт «Картофель». Процесс выполнения анализа отображается на индикаторе  в строке состояния в нижнем левом углу окна. После завершения анализа появляется надпись Готово.

8.2 Создание схемы анализа

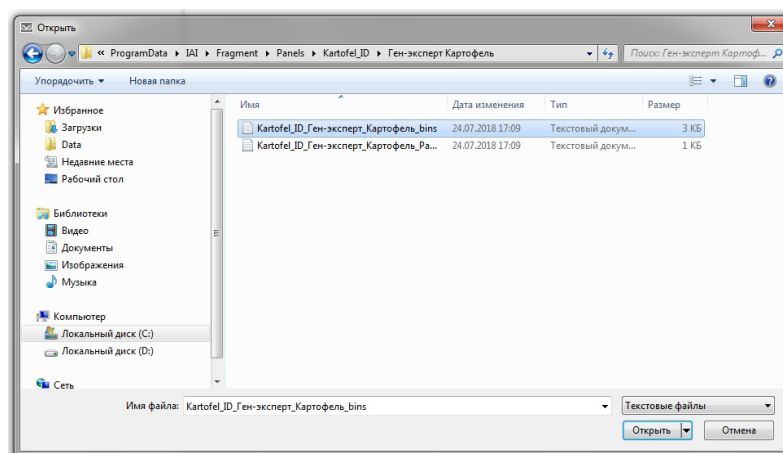
Для изменения/создания параметров в программе, перейти в режим Эксперта (Пароль - Expert2).

Шаг А Импорт бинов

Перейти Файл → Импорт бинов.



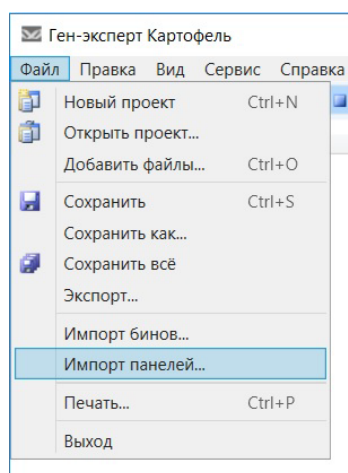
Выбрать в папке *C:\ProgramData\IAI\Fragment\Panels/Kartofel_ID*. файл с актуальными бинами (предоставляет разработчик программного обеспечения ИАП РАН).



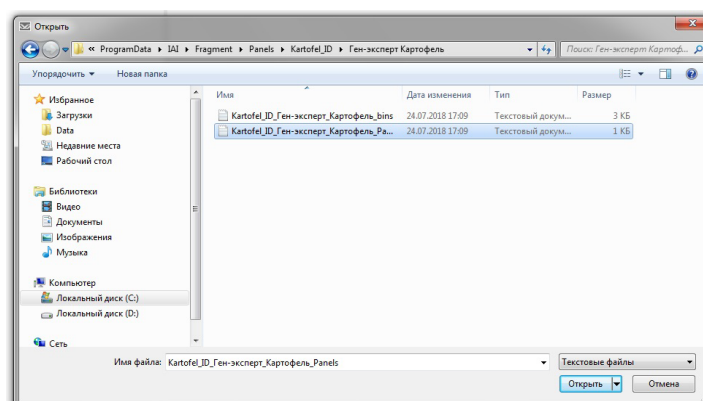
Если в папке отсутствует файл, запросить его у производителя наборов, скопировать в указанную папку и выбрать через опцию Импорт бинов.

Шаг Б Импорт панелей

Перейти Файл → Импорт панелей.

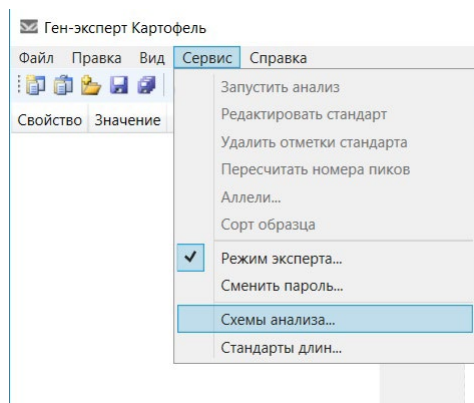


Импортировать панели аналогично импорту бинов.

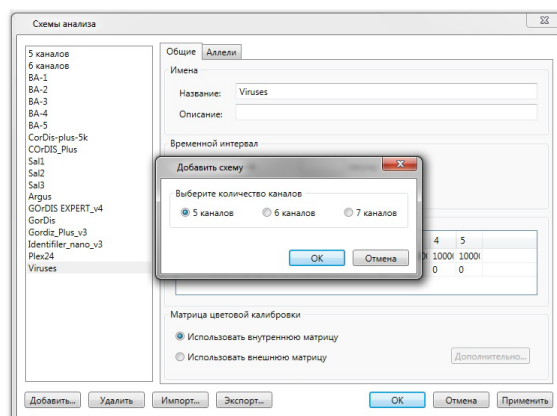


Шаг В Создание схемы

Перейти Сервис → Схемы анализа.



В окне Схемы анализа нажать кнопку **Добавить**, в окне **Добавить схему** выбрать количество каналов — 5 и нажать **ОК**.



Во вкладке **Общие** исправить появившееся **Название** на «ГенЭксперт «Картофель»», в таблице **Характеристика пиков** установить рекомендованные производителем набора значения, и убедиться, что маркер  матрицы цветовой калибровки активирован для использования внутренней матрицы.

Минимальная высота пика по каналам:

1 – 5000; 2 – 5000; 3 – 5000; 4 – 5000; 5 - 3000

Минимальная ширина на полувысоте – 0,5 (для каждого пика).

Схемы анализа

BA-1-5
BA-2-5
BA-3-5
BA-4-5
BA-5-5
BA_3_6
GE-Potato_150425_5
GE-Potato_150425_6
GE-Potato_1024
GE-Vitis_5_300625
GenExpert-Potato_030725
S.t_1
S.t_2
S.t_3
VITIS_210125_25

Общие Аллели

Имена

Название: GenExpert-Potato_030725
Описание:

Временной интервал

☐ Начало анализа секунд
☐ Окончание анализа секунд

Характеристики пиков

Параметр	1	2	3	4	5
Минимальная высота пика	5000	5000	5000	5000	3000
Минимальная ширина на полувысоте, с	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Матрица цветовой калибровки

☒ Использовать внутреннюю матрицу
☐ Использовать внешнюю матрицу

Дополнительно...

Добавить... Удалить Импорт... Экспорт...

OK Отмена Применить

Во вкладке Аллели развернуть список Панель и выбрать Kartoffel_ID_v

Схемы анализа

5 каналов
6 каналов
BA-1
BA-2
BA-3
BA-4
BA-5
CorDis-plus-5k
COrDIS_Plus
Sal1
Sal2
Sal3
Картофель
GlobalFiller
GorDis
Identifier_nano_v3
Kartofel_10_ABI
Kartofel_v2401
Plex24
Ген-эксперт Картофель

Общие Аллели

Идентификационный анализ

Панель: Kartoffel_ID_v10
Нет
24plex_Panels_v4
Argus_X12_Panels_v3
Argus_X12_QS_Panels_v2
Argus_Y_12_Panels_v3
COrDIS_Plus
ESSplex_Plus_Panels_v5
ESSplex_SE_Plus_Panels_v4
ESSplex_SE_QS_v2
GlobalFiler_Express_Panel_EE
HDplex_Panels_v5
Identifier_Plus_Panels_v1X
IDplex_Plus_Panels_v4
Kartofel_ID_v10

Уровень ф
Соотноше
Начальное
Конечное
Начальное
Конечное

Дополнительно

Уровень фильтрации минорных пиков: 0

Добавить... Удалить Импорт... Экспорт...

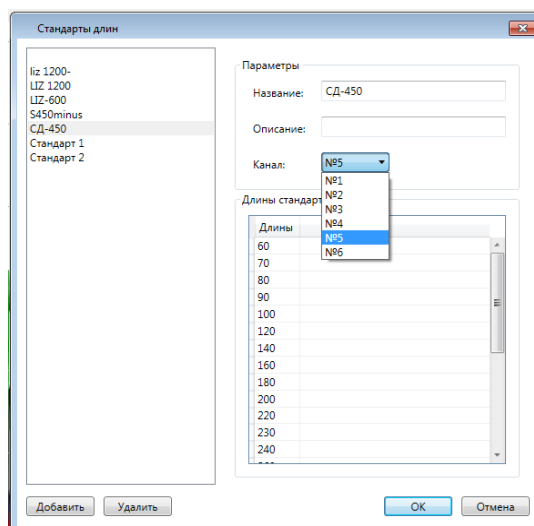
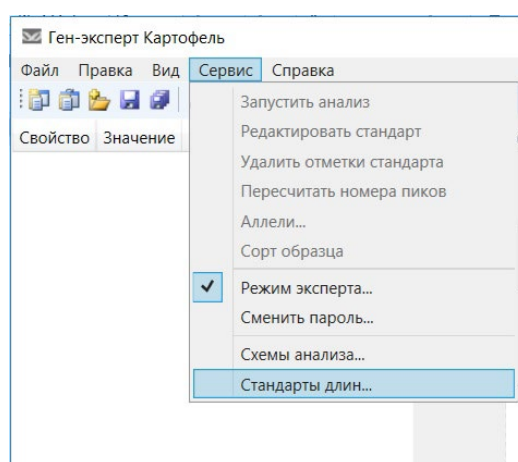
OK Отмена Применить

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

1. Перейти Сервис → Стандарты длин.



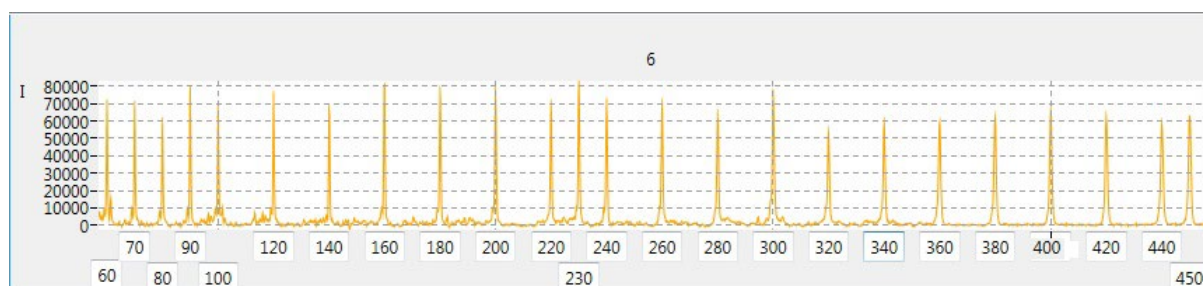
2. В окне Стандарты длин нажать кнопку **Добавить**, в части окна **Параметры** ввести **Название** стандарта длины **СД-450**, а в списке **Канал** выбрать **№5**.
3. В таблице **Длины стандарта** ввести значения длин от меньших к большим в соответствии с данными, приведенными в [пункте 8.4](#) (рисунок 2) и нажать **ОК**.

Длины стандарта

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

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.

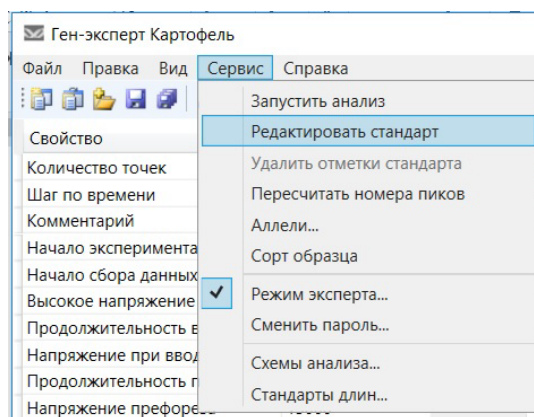


8.5 Интерпретация результатов анализа

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:

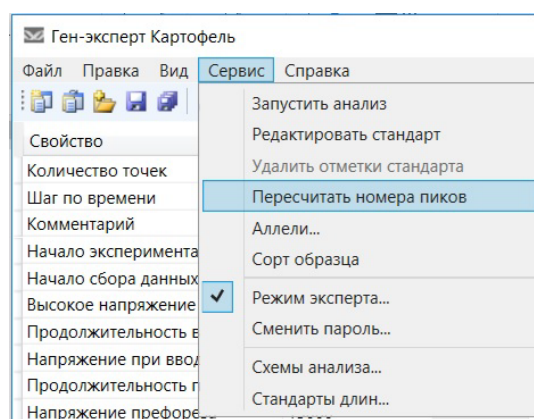
- 1) Оставить только канал , соответствующий красителю, входящему в состав фрагментов стандарта длины (5 канал).
- 2) Перейти Сервис → Редактировать стандарт.



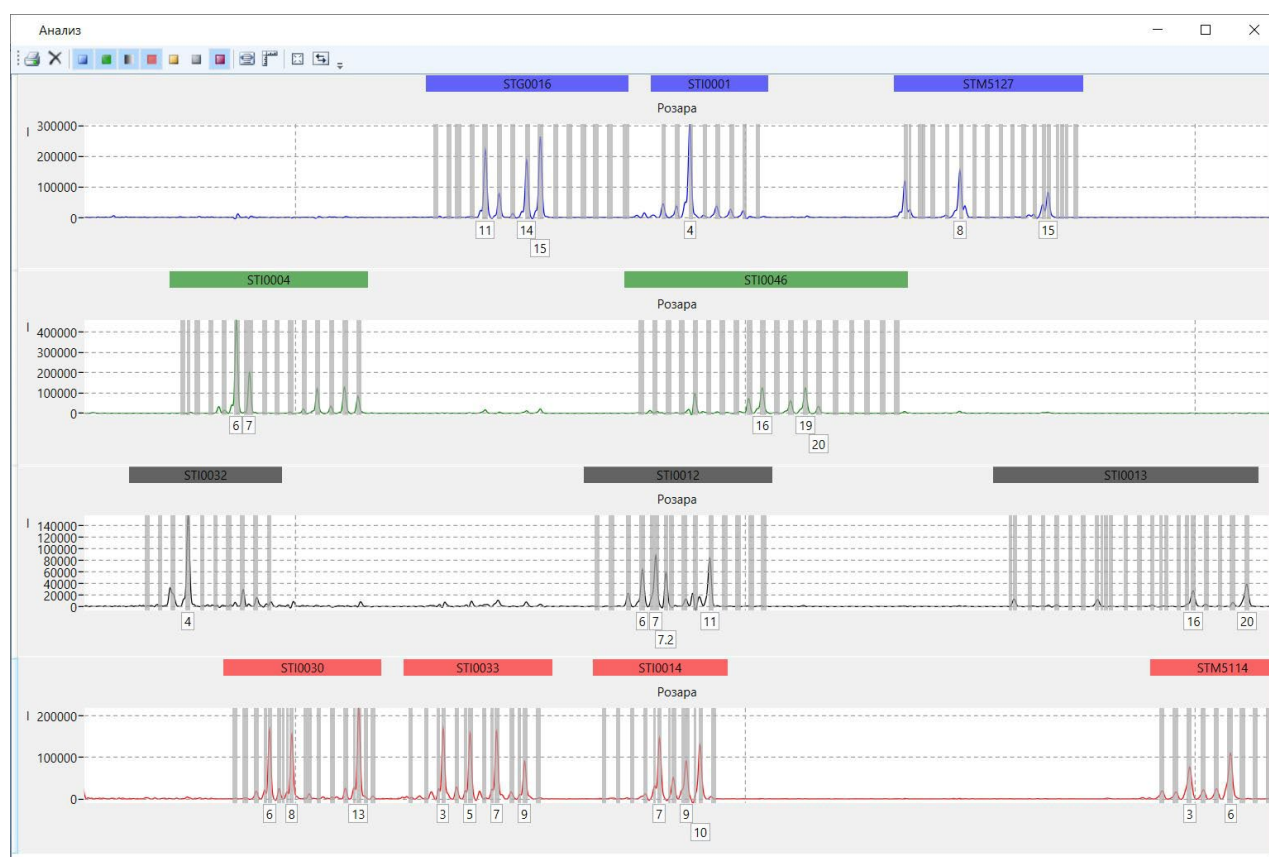
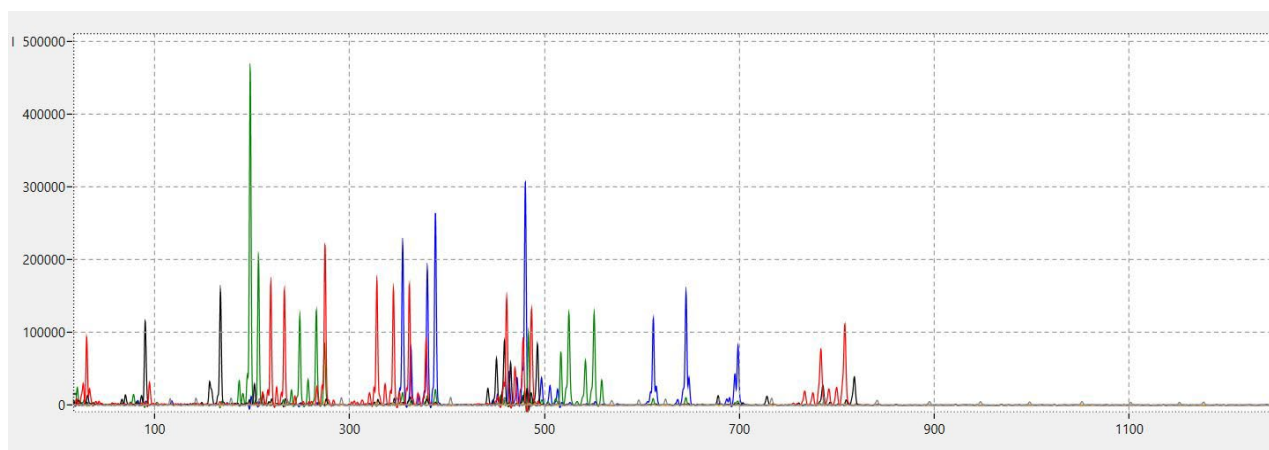
- 3) Ввести в столбце **Длина фрагмента** значения, соответствующие пикам стандарта длин, и каждый из них отметить ☒ как **Пик стандарта**.

На Ти Ор	Канал	№ пика	Высота	Время выхода	Ширина на полувысоте	Длина фрагмента	Пик стандарта	Маркер	Аллель	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.



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



Канал	№ пика	Высота	Время выхода	Площадь	Длина фрагмента	Маркер	Аллель
1	13	136493	936,0	363231	138,13	STG0016	11
1	17	239362	982,8	636983	147,57	STG0016	14
1	19	110725	998,0	294657	150,69	STG0016	15
1	22	195333	1164,8	571794	184,36	STI0001	4
1	24	49021	1195,0	143498	190,35	STI0001	6
1	27	101583	1417,5	270330	235,98	STM5127	5
1	31	40107	1558,0	106733	264,96	STM5127	14
2	23	60411	1314,0	176840	214,67	STI0046	20
2	21	38326	1284,3	112191	208,46	STI0046	18
2	20	56566	1239,8	165584	199,21	STI0046	15
2	12	85410	757,0	227291	103,39	STI0004	12
2	9	55441	661,5	147537	85,28	STI0004	6
2	14	37667	788,3	100238	109,53	STI0004	14
3	40	40100	1658,8	117385	285,82	STI0013	9
3	41	23114	1760,3	73811	306,82	STI0013	16
3	39	44424	1565,0	130041	266,41	STI0013	3
3	19	17379	727,8	55499	97,71	STI0032	9
3	35	58428	1178,0	139937	186,98	STI0012	7
3	18	49943	712,5	159488	94,81	STI0032	8
3	15	86886	647,5	277461	82,71	STI0032	4
3	38	262908	1238,8	769605	199,01	STI0012	11
4	54	65761	1722,8	192501	299,12	STM5114	1
4	18	105241	757,8	280064	103,54	STI0030	8

Результаты анализа образцов с оценкой качества *Хорошее* и *Среднее* доступны для просмотра в окне Аллели (кнопка ).

Для анализа результатов рекомендуется следующий алгоритм:

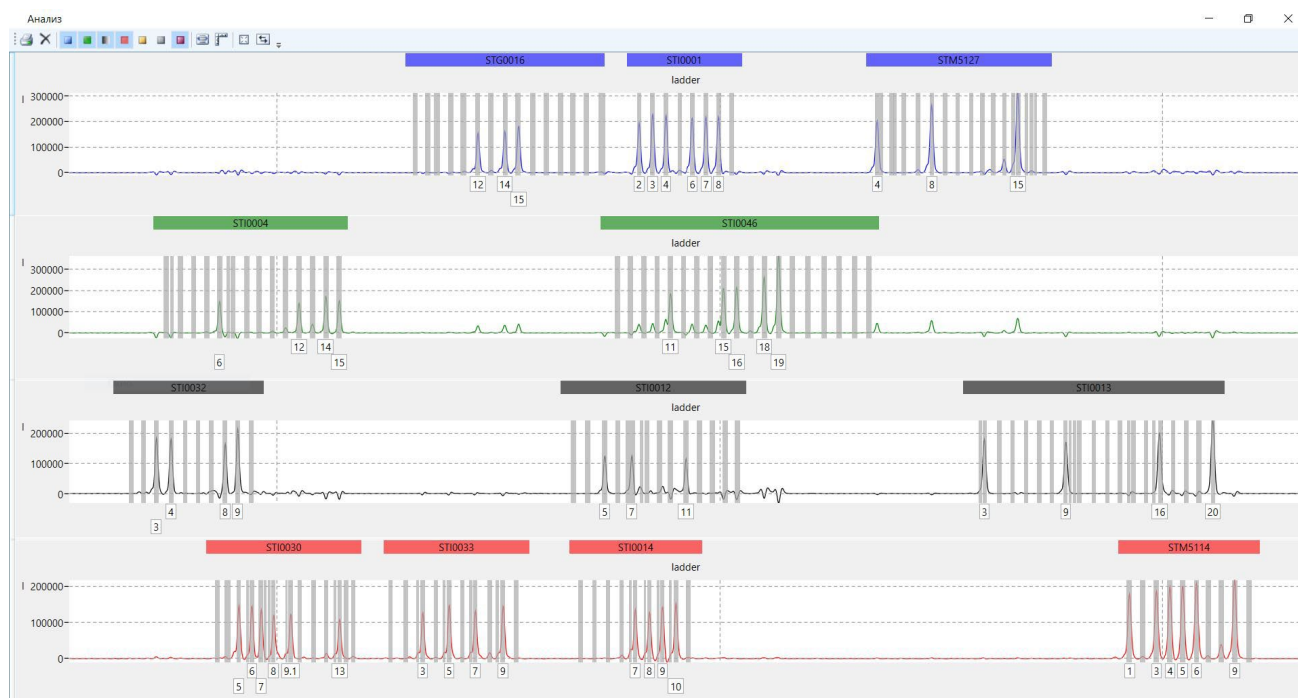
Шаг А Анализ аллельной лестницы

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 «Картофель» выделить строку с аллельной лестницей и нажать кнопку  Аллели.

№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин	Качество
16	Готов к анализу	☐	17_C1	17	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
17	Готов к анализу	☐	17-3107-1_G1	17-3107-1	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
18	Готов к анализу	☐	17-3107-2_E1	17-3107-2	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
19	Готов к анализу	☐	21_D1	21	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
20	Готов к анализу	☐	21-3107-2_F1	21-3107-2	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
21	Проанализирован	☒	алл_Н1	аллельная лестница	Аллельная лестница	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее

- 2) Нажать кнопку  Печать.
- 3) Визуально убедиться, что все пики фрагментов аллельной лестницы имеют под осью X значения, соответствующие их длине и количеству коротких tandemных повторов.
- 4) Если пики фрагментов аллельной лестницы не соответствуют их длине и количеству коротких tandemных повторов, то необходимо произвести редактирование бинов.



LADDER-ГЭ-К	Аллельное состояние
STG0016 FAM	12-14-15
STI001 FAM	2-3-4-6-7-8
STM5127 FAM	4-8-15
STI004 R6G	6-12-14-15
STI0046 R6G	11-15-16-18-19
STI0032 TAMRA	3-4-8-9
STI0012 TAMRA	5-7-11
STI0013 TAMRA	3-9-16-20
STI0030 ROX	5-6-7-8-9.1-13
STI0033 ROX	3-5-7-9
STI0014 ROX	7-8-9-10
STM5114 ROX	1-3-4-5-6-9

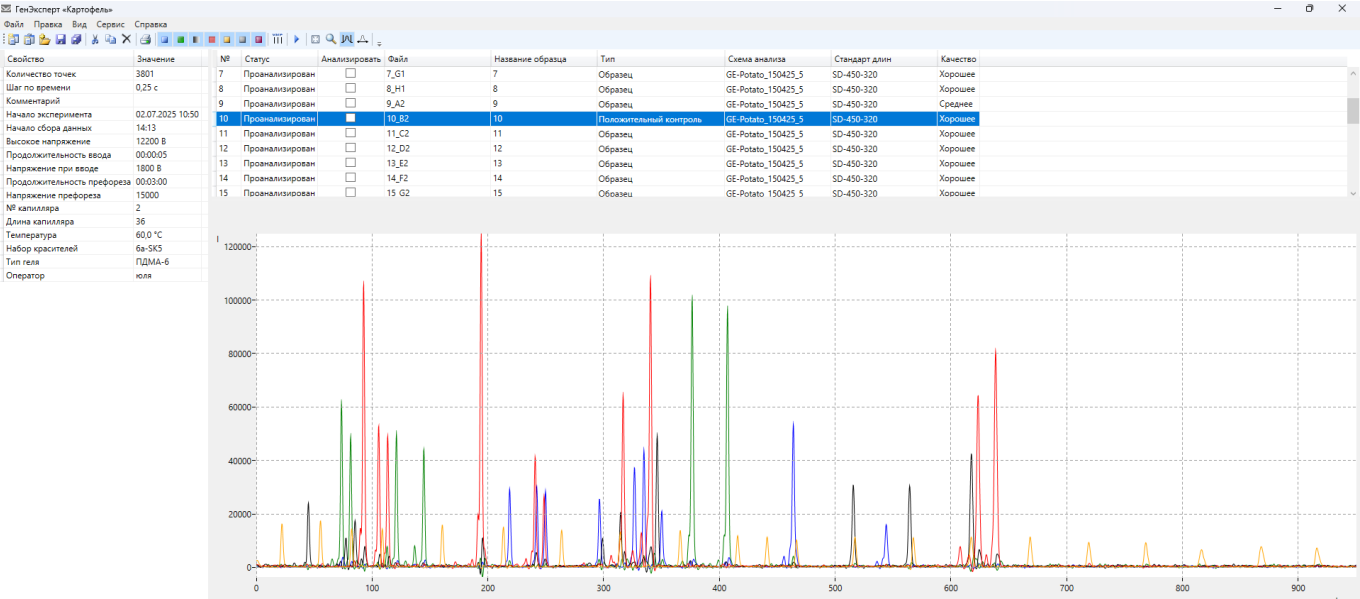
Шаг Б Анализ отрицательного контрольного образца

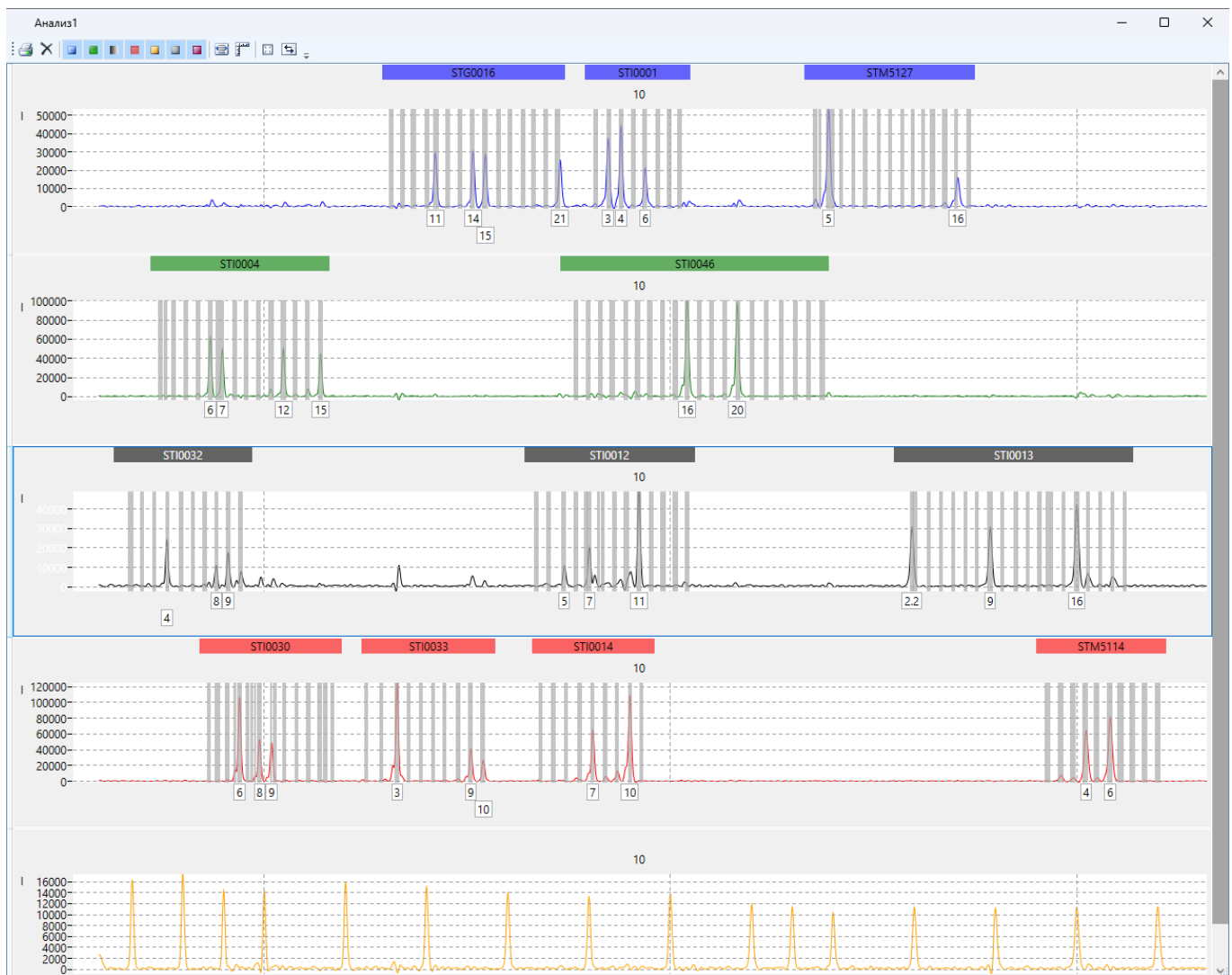
Необходимо убедиться, что в диапазоне выхода целевых фрагментов отсутствуют какие-либо пики, кроме пиков размерного стандарта.

Шаг В 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". Ниже пример ПКО.

ПКО-ГЭ-К	Ред Скарлет
STG0016 FAM	11-14-15-21
STI001 FAM	3-4-6
STM5127 FAM	5
STI004 R6G	6-7-12-15
STI0046 R6G	16-20
STI0032 TAMRA	4-8-9
STI0012 TAMRA	5-7-11
STI0013 TAMRA	2.2-9-16
STI0030 ROX	6-8-9
STI0033 ROX	3-9
STI0014 ROX	7-10
STM5114 ROX	4-6





№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа
7	Проанализирован	☐	7_G1	7	Образец	GE-Potato_150425_5
8	Проанализирован	☐	8_H1	8	Образец	GE-Potato_150425_5
9	Проанализирован	☐	9_A2	9	Образец	GE-Potato_150425_5
10	Проанализирован	☐	10_B2	10	Положительный контроль	GE-Potato_150425_5
11	Проанализирован	☐	11_C2	11	Образец	GE-Potato_150425_5
12	Проанализирован	☐	12_D2	12	Образец	GE-Potato_150425_5
13	Проанализирован	☐	13_E2	13	Образец	GE-Potato_150425_5
14	Проанализирован	☐	14_F2	14	Образец	GE-Potato_150425_5
15	Проанализирован	☐	15_G2	15	Образец	GE-Potato_150425_5

ГенЭксперт «Картофель»

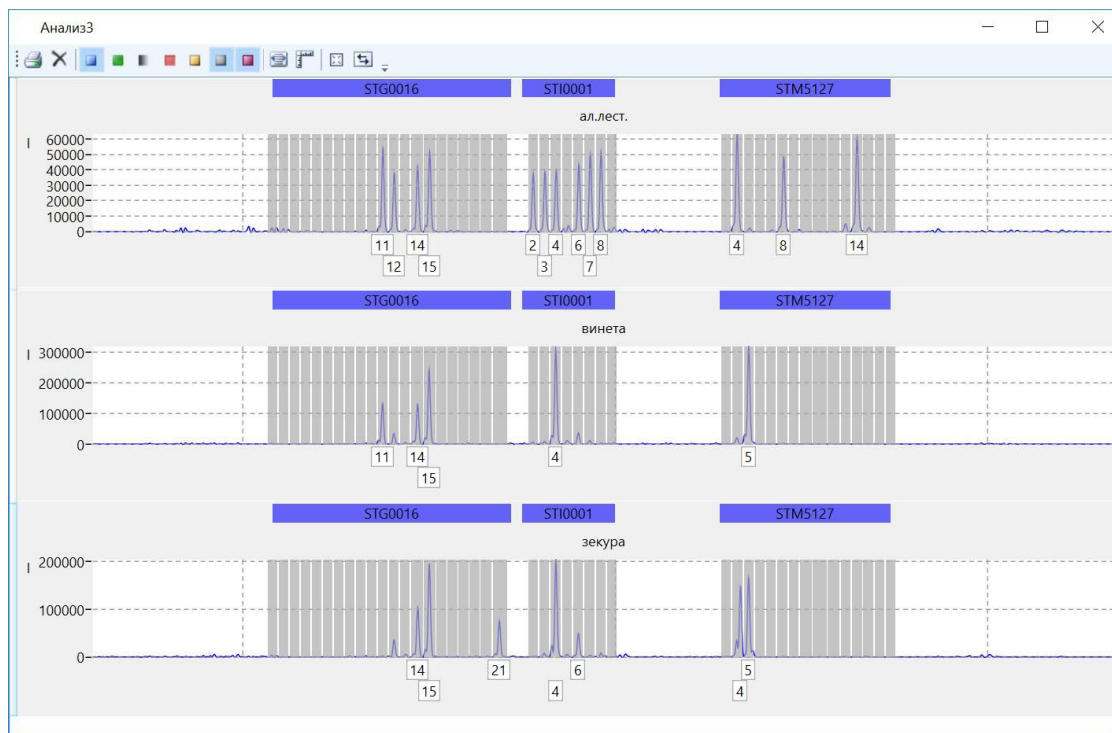
Генотип соответствует сорту Ред Скарлет.

Печать отчета OK

Результат анализа сорта Ред Скарлет, полученный с помощью набора «ГенЭксперт «Картофель»

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 , можно получить в окне совмещенные электрофореграммы нескольких образцов. Ниже показан одновременный просмотр результатов анализа аллельной лестницы и двух сортов картофеля по каналу FAM:



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

Удалить подпись под пиком можно, выставив курсор в соответствующий квадрат под пиком и нажав кнопку  Удалить подпись.

Для получения протокола исследования выполнить команды: Файл-Печать . Программа выдаст отчет на двух листах. На первом листе выводится общая хроматограмма, панель аллелей по 12 локусам, таблица с генотипом по 12 локусам и заключение с выводом названия сорта. На втором листе выводится общая хроматограмма аллельной лестницы и панель аллелей по 12 локусам.

8.6 Формирование протокола исследования

Протокол исследования формируется автоматически при нажатии кнопки Печать протокола.



Ген-эксперт Картофель

Ф. И. О. эксперта _____

Дата _____ 20__ г.

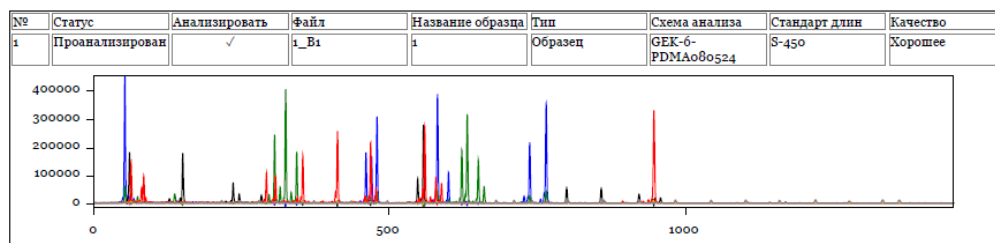
Протокол исследования

Заключение: Генотип соответствует сорту Третьяковка

Генотип 12 локусов

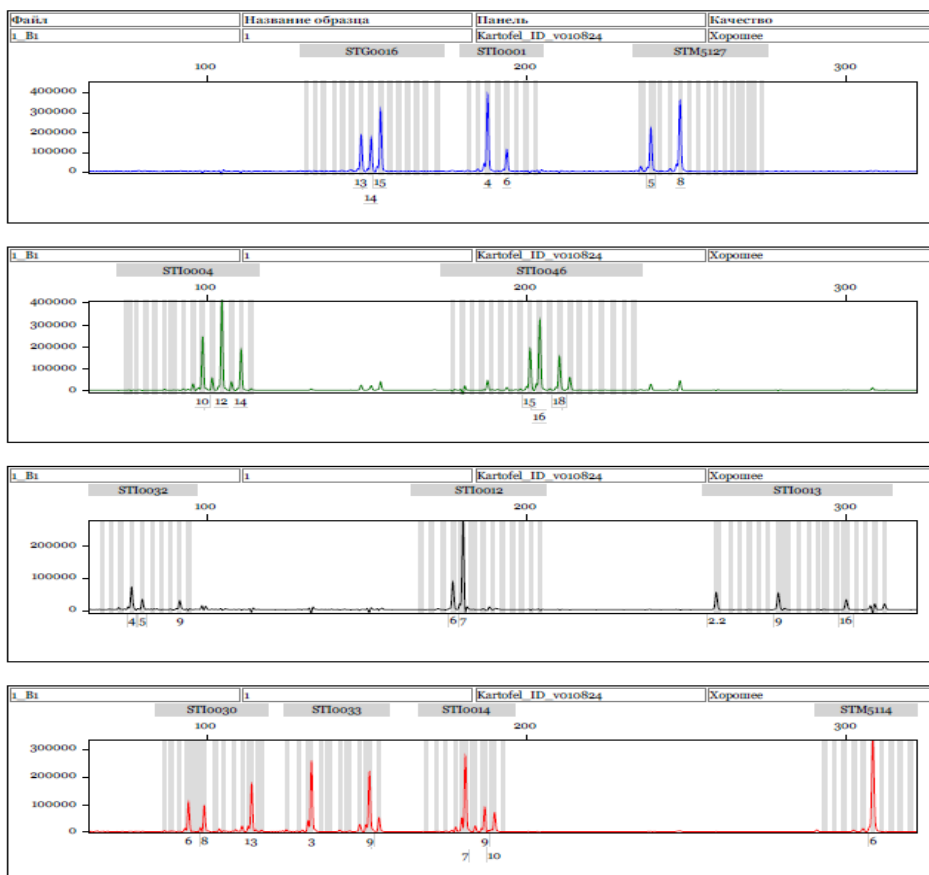
№	Образец	STG0016	STI0001	STM5127	STI0004	STI0046	STI0032	STI0012	STI0013	STI0030	STI0033	STI0014	STM5114
		107-107	109-196	223-208	67-112	160-220	61-88	172-209	203-317	81-118	126-156	161-191	291-321
1	1	13-14-15	4-6	5-8	10-12-14	15-16-18	4-5-9	6-7	2-2-9-16	6-8-13	3-9	7-9-10	6
	Третьяковка	13-14-15	4-6	5-8	10-12-14	15-16-18	4-5-9	6-7	2-2-9-16	6-8-13	3-9	7-9-10	6

Общая хроматограмма

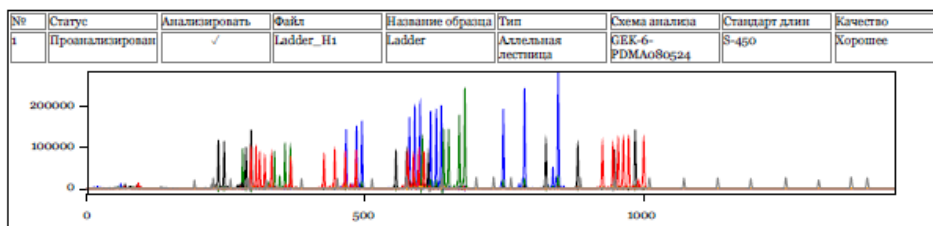


Ген-эксперт Картофель

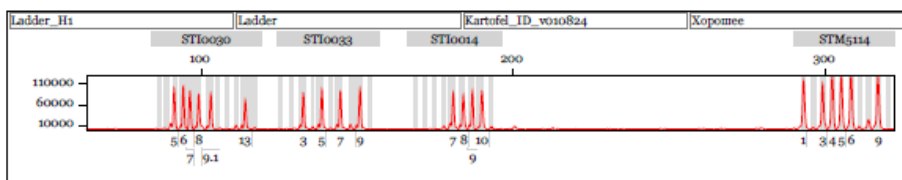
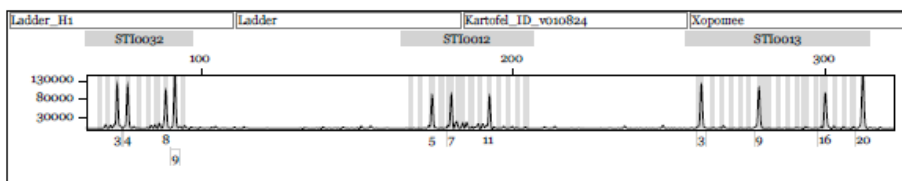
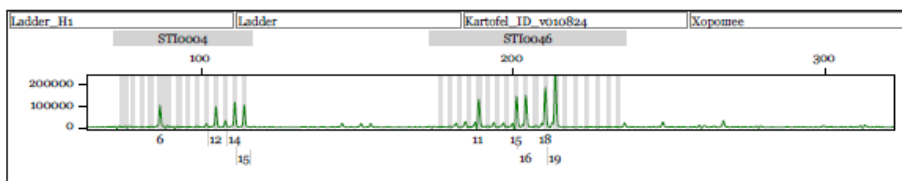
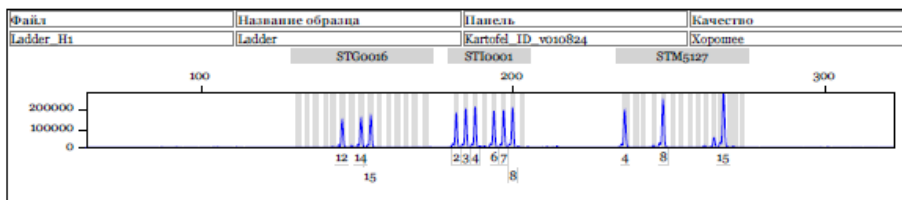
Панель аллелей по 12 локусам



Общая хроматограмма аллельной лестницы



Панель аллелей по 12 локусам



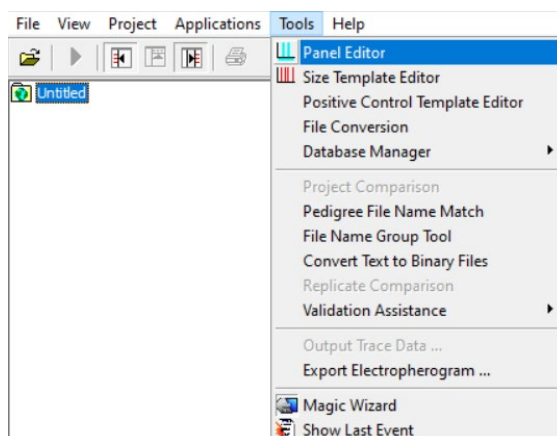
9. АНАЛИЗ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПО «GeneMarker».

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

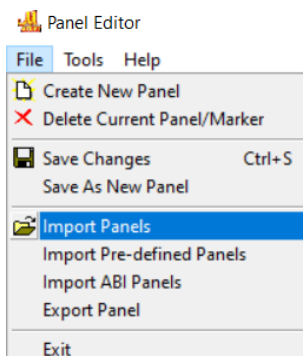
9.1 Импорт файлов для анализа данных

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

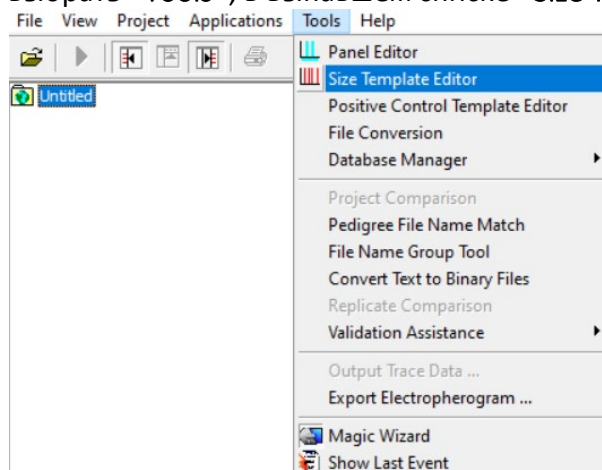
1. Запустить программу «GeneMarker». В верхнем меню выбрать «Tools», в выпавшем списке «Panel Editor»



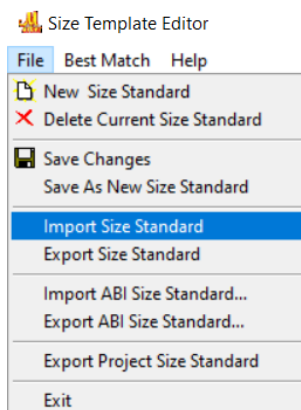
2. В открывшемся окне выбрать «File» в выпавшем списке «Import Panels»



3. Выбрать папку с файлом панели GenExpert-Potato 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»

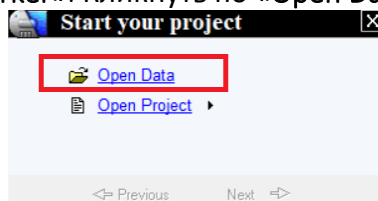


7. Выбрать папку с файлом размерного стандарта SD450 и подгрузить его в программу «GeneMarker»

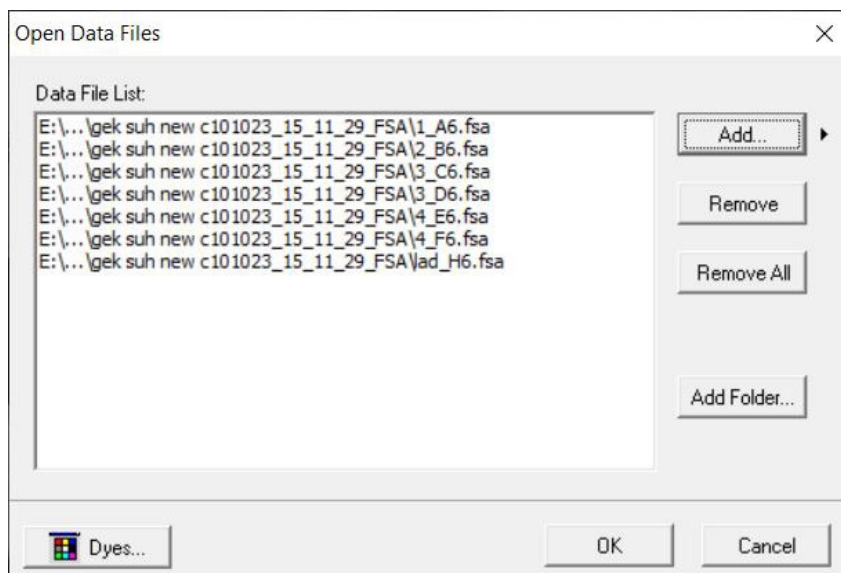
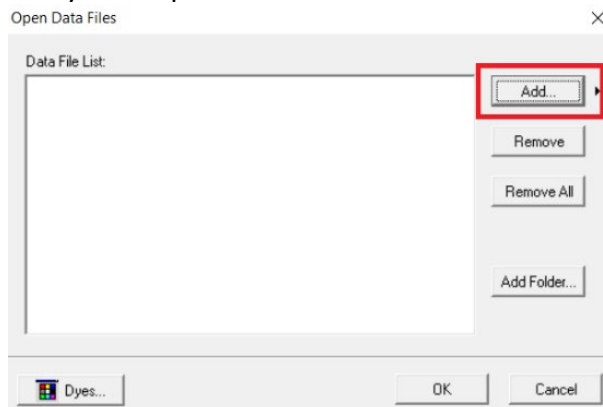
8. Закрыть окно «Size Template Editor»

9.2 Создание проекта анализа данных

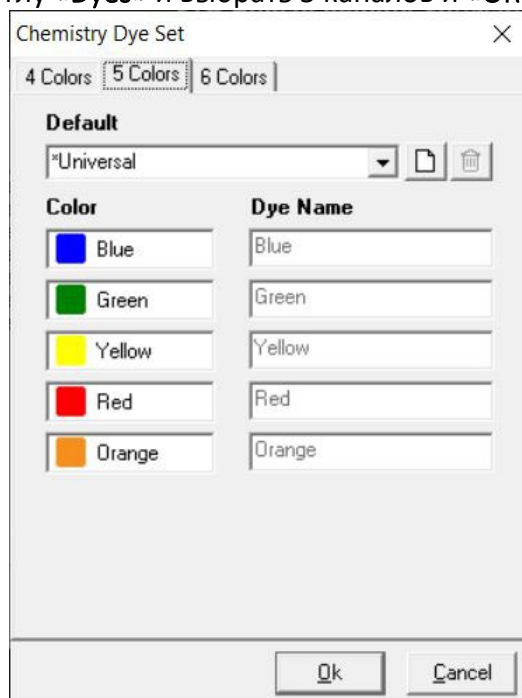
1. Запустить программу «GeneMarker». Кликнуть по «Open Data» в окне «Start your project»



2. Нажать «Add» и загрузить нужные файлы

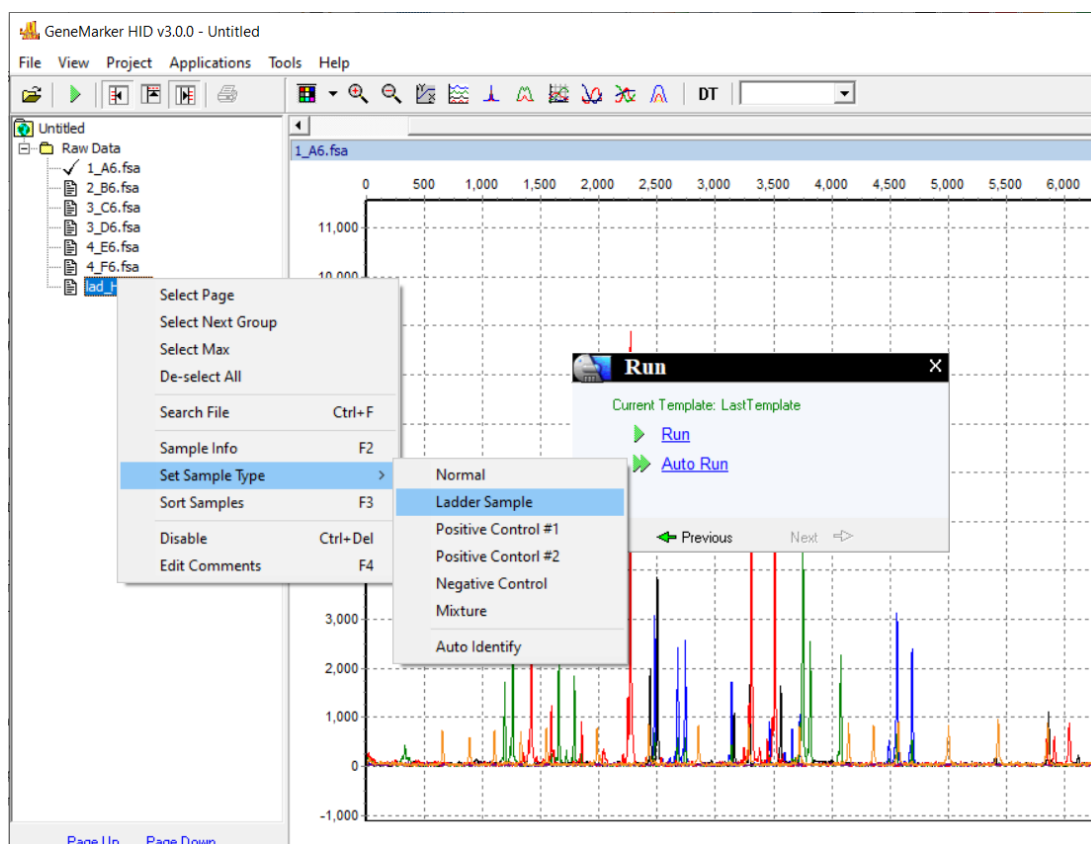


3. Нажать в левом нижнем углу «Dyes» и выбрать 5 каналов и «OK».

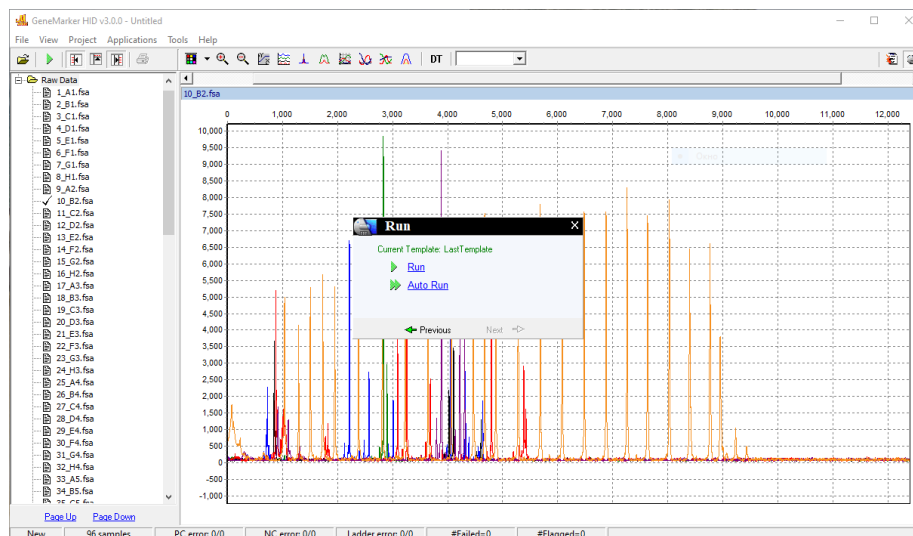


4. После добавления файлов нажать «OK».

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-Potato**», в графе «**Panel**» выбрать панель «**GenExpert-Potato**», в графе «**Size Standard**» выбрать размерный стандарт «**SD450**», выбрать цвет в «**Standard Color**» - «**Orange**», нажать «**Save**» и затем «**Next**».

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

Run Wizard

Data Process - HID Analysis

Set data process options

Raw Data Analysis

☒ Auto Range (frame)

Start: 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.

Data processing...

Events:

60_U8.fsa...Completed.

61_E8.fsa...Completed.

62_F8.fsa...Completed.

63_G8.fsa...Completed.

64_H8.fsa...Completed.

65_A9.fsa...Completed.

66_B9.fsa...Completed.

67_C9.fsa...Completed.

68_D9.fsa...Completed.

69_E9.fsa...Completed.

70_F9.fsa...Completed.

71_G9.fsa...Completed.

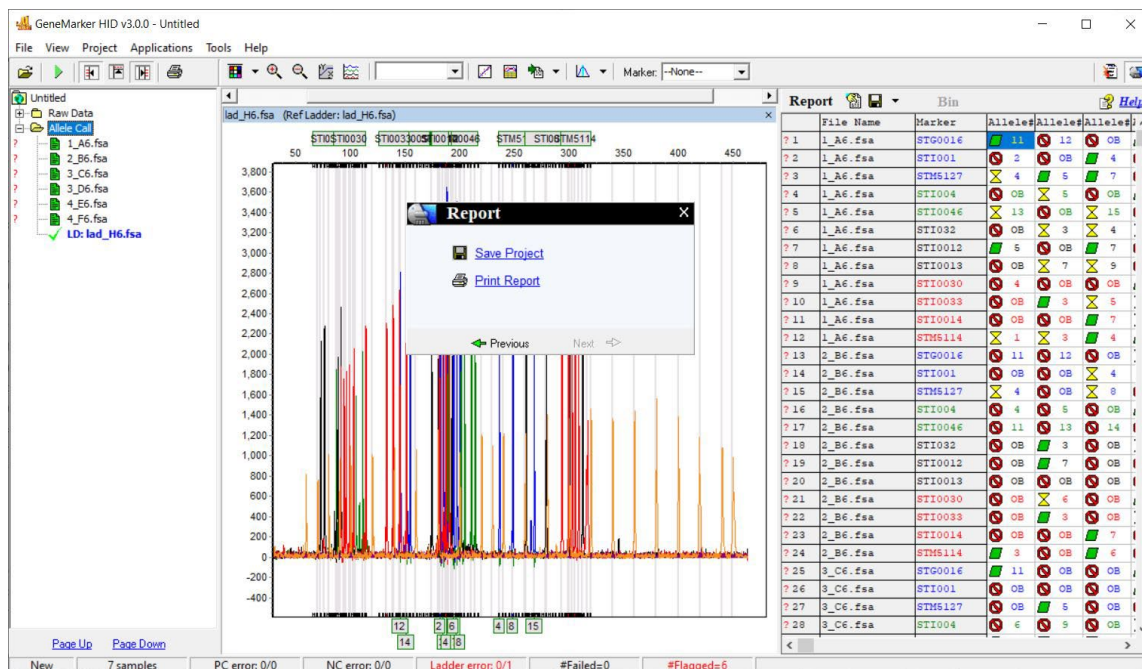
72_H9.fsa...Completed.

AL_A10.fsa...Completed.

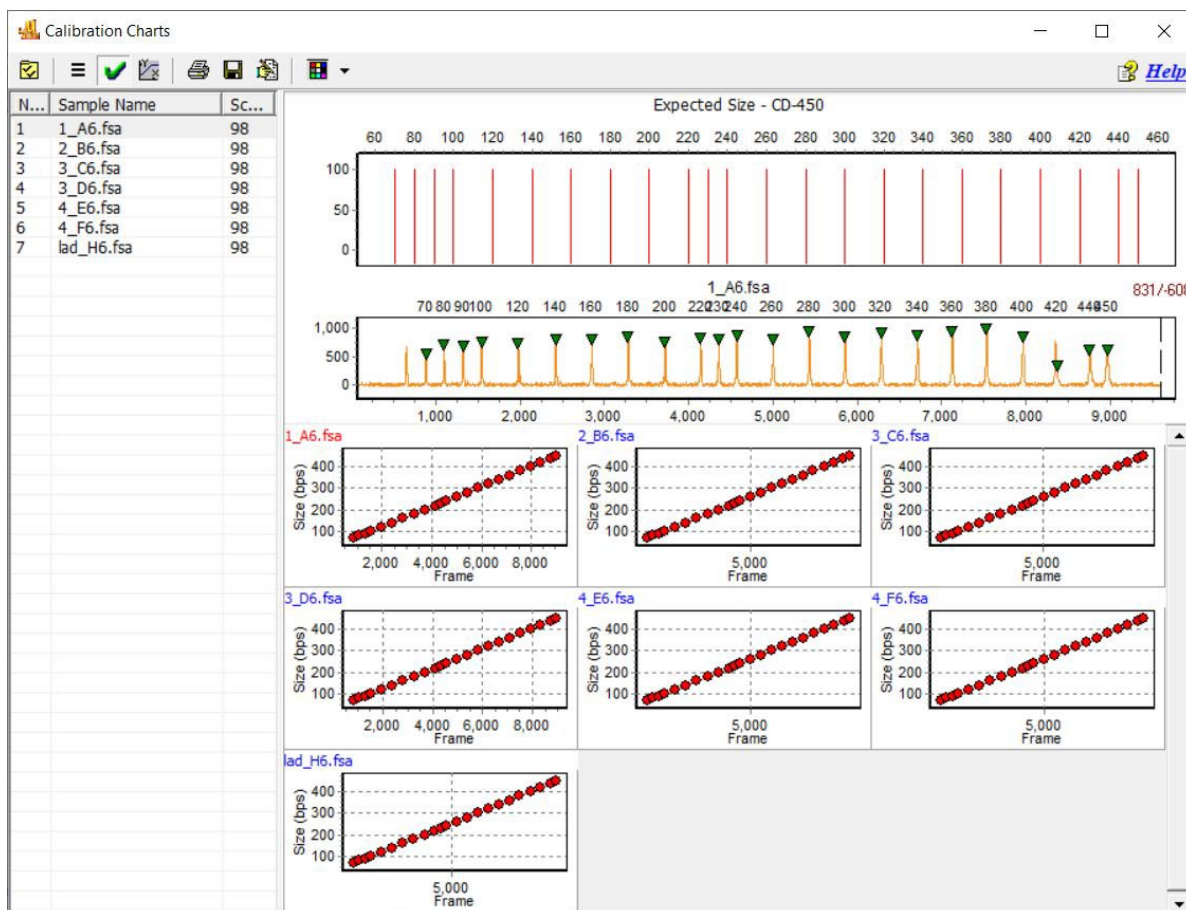
AL_B10.fsa...Completed.

AL_C10.fsa...Completed.

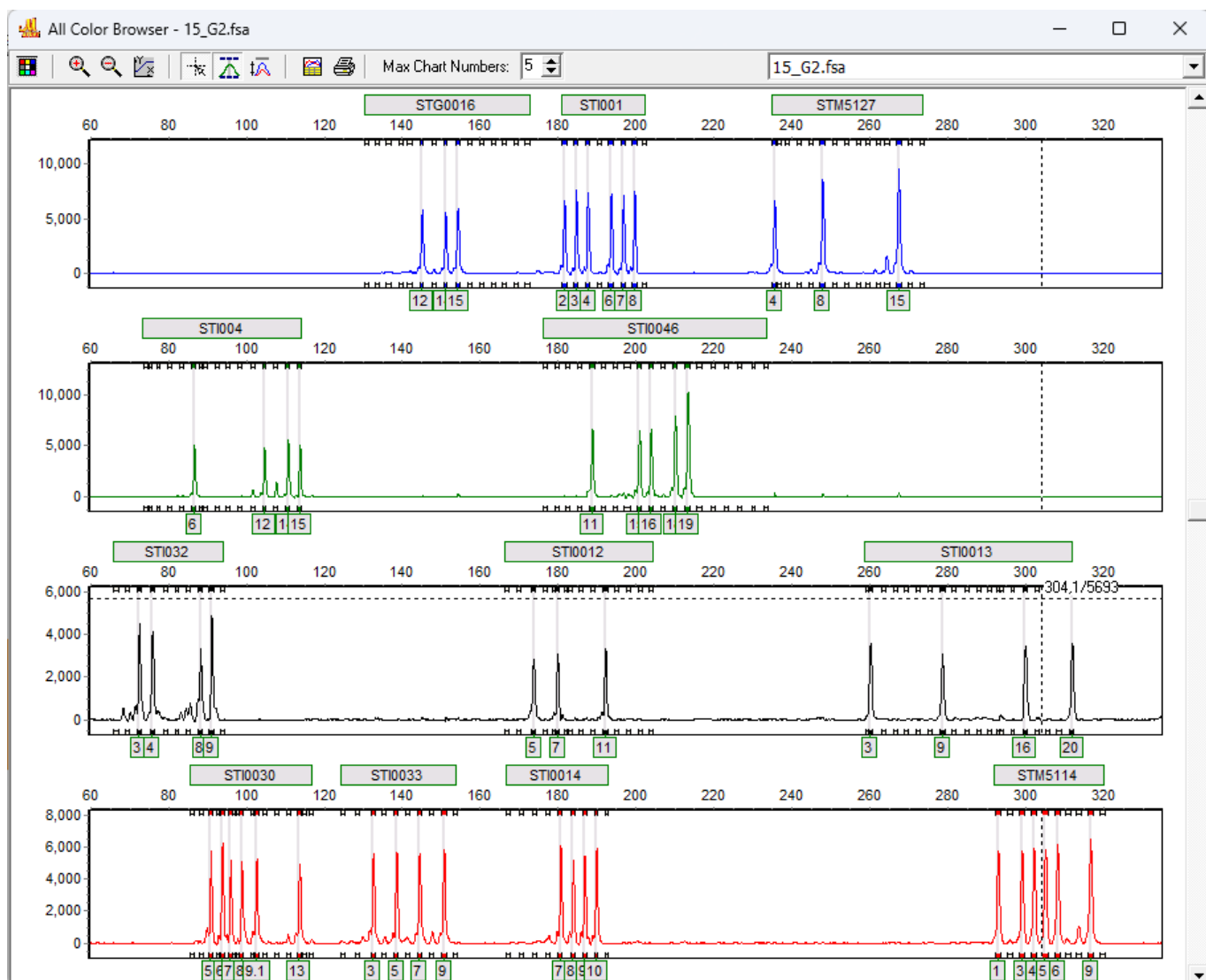
Ok



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

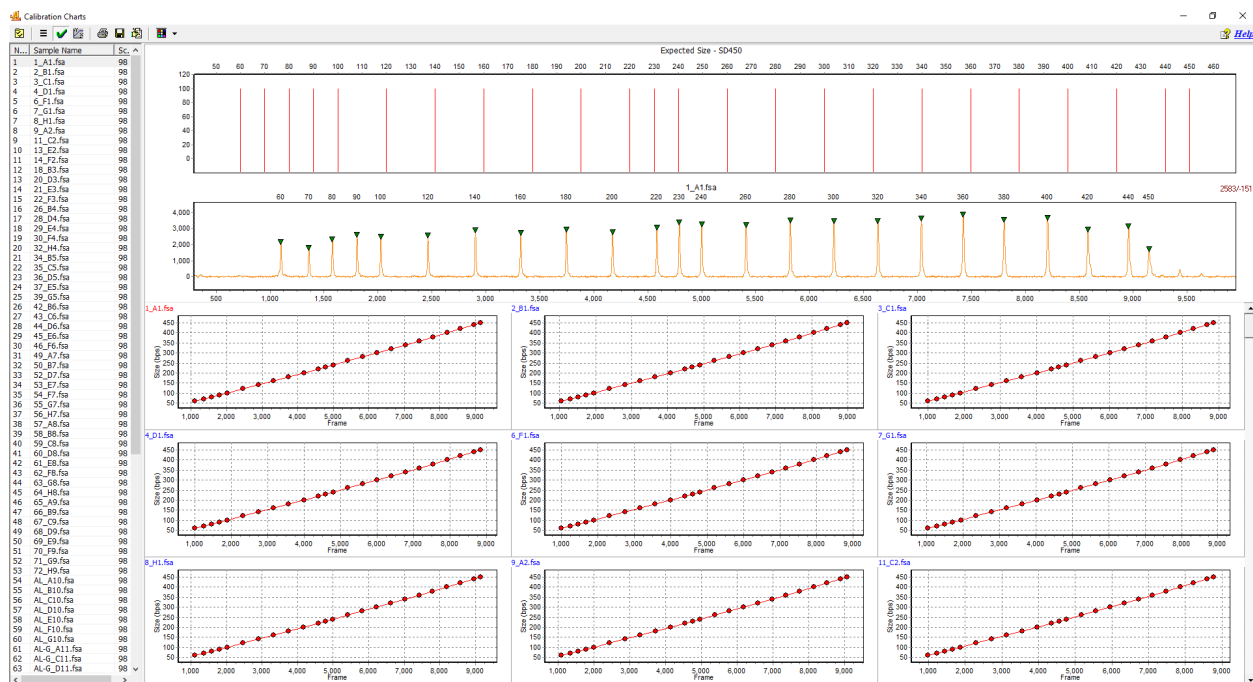


12. В окне «Browse by All Color» проверить расстановку Аллельной лестницы.



9.3 Размерный стандарт СД-450

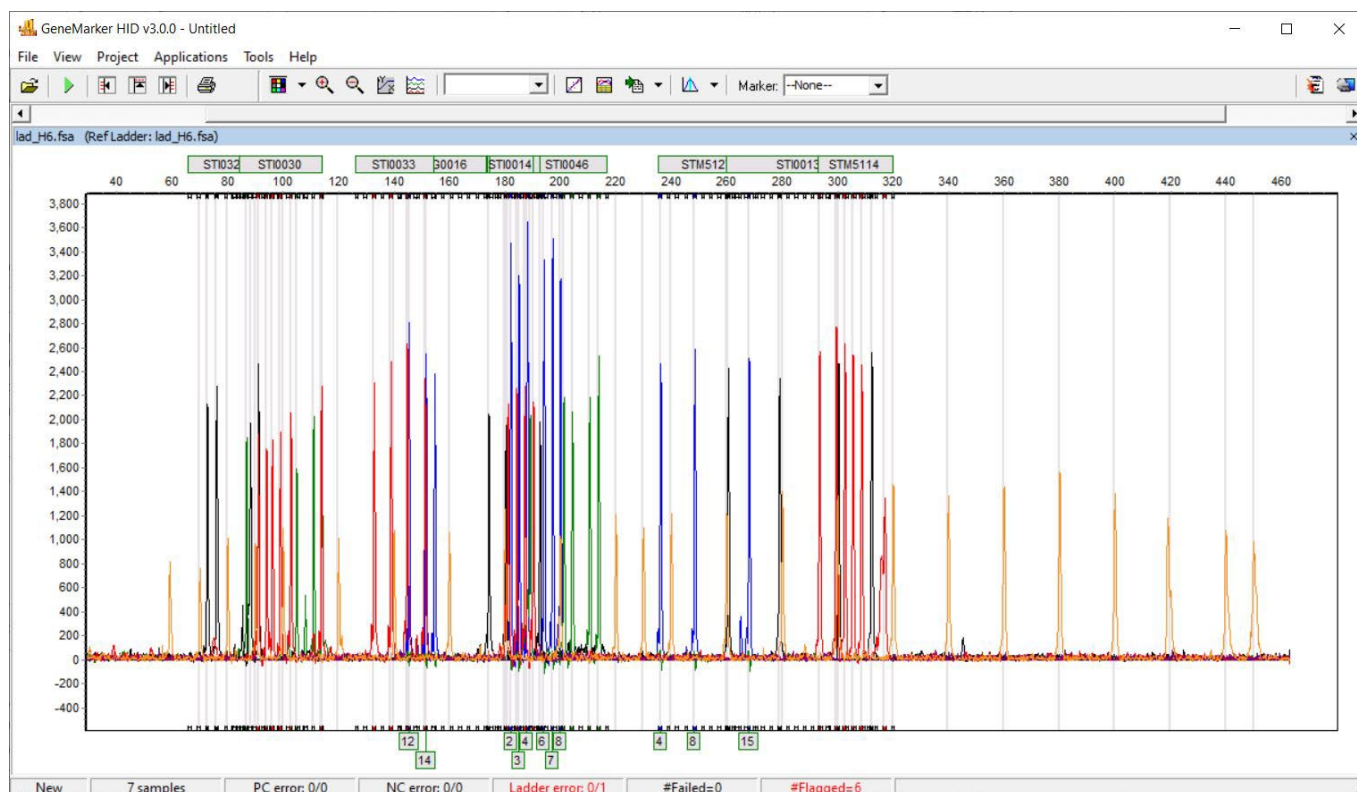
Ниже приводится пример электрофоретического разделения 24 фрагментов стандарта длины СД-450 в канале детекции SY660 (5-ый из 6-ти каналов детекции). Размеры фрагментов: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450.



9.4 Анализ аллельной лестницы

Ниже приводится расстановка электрофоретически разделенных 52 фрагментов **Аллельной лестницы** по 4 каналам детекции.

LADDER-ГЭ-К	Аллельное состояние
STG0016 FAM	12-14-15
STI001 FAM	2-3-4-6-7-8
STM5127 FAM	4-8-15
STI004 R6G	6-12-14-15
STI0046 R6G	11-15-16-18-19
STI0032 TAMRA	3-4-8-9
STI0012 TAMRA	5-7-11
STI0013 TAMRA	3-9-16-20
STI0030 ROX	5-6-7-8-9.1-13
STI0033 ROX	3-5-7-9
STI0014 ROX	7-8-9-10
STM5114 ROX	1-3-4-5-6-9



9.5 Анализ положительного контрольного образца (ПКО)

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 (ПКО)

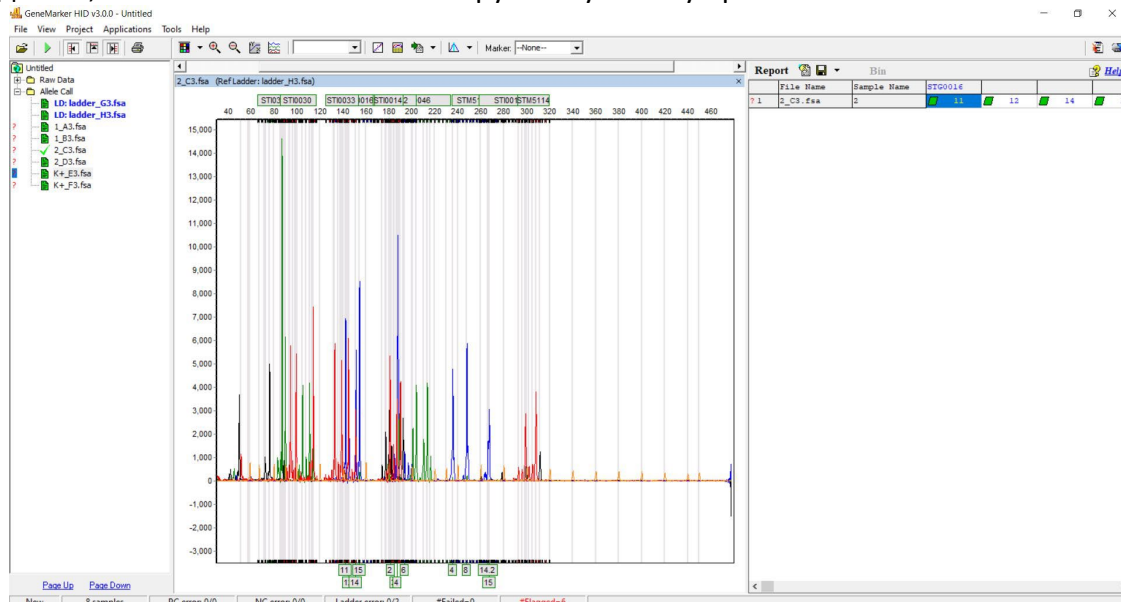
ПКО-ГЭ-К	Ред Скарлет
STG0016 FAM	11-14-15- 21
STI001 FAM	3-4-6
STM5127 FAM	5
STI004 R6G	6-7-12-15
STI0046 R6G	16-20
STI0032 TAMRA	4-8-9
STI0012 TAMRA	5-7-11
STI0013 TAMRA	2.2-9-16
STI0030 ROX	6-8-9
STI0033 ROX	3-9
STI0014 ROX	7-10
STM5114 ROX	4-6

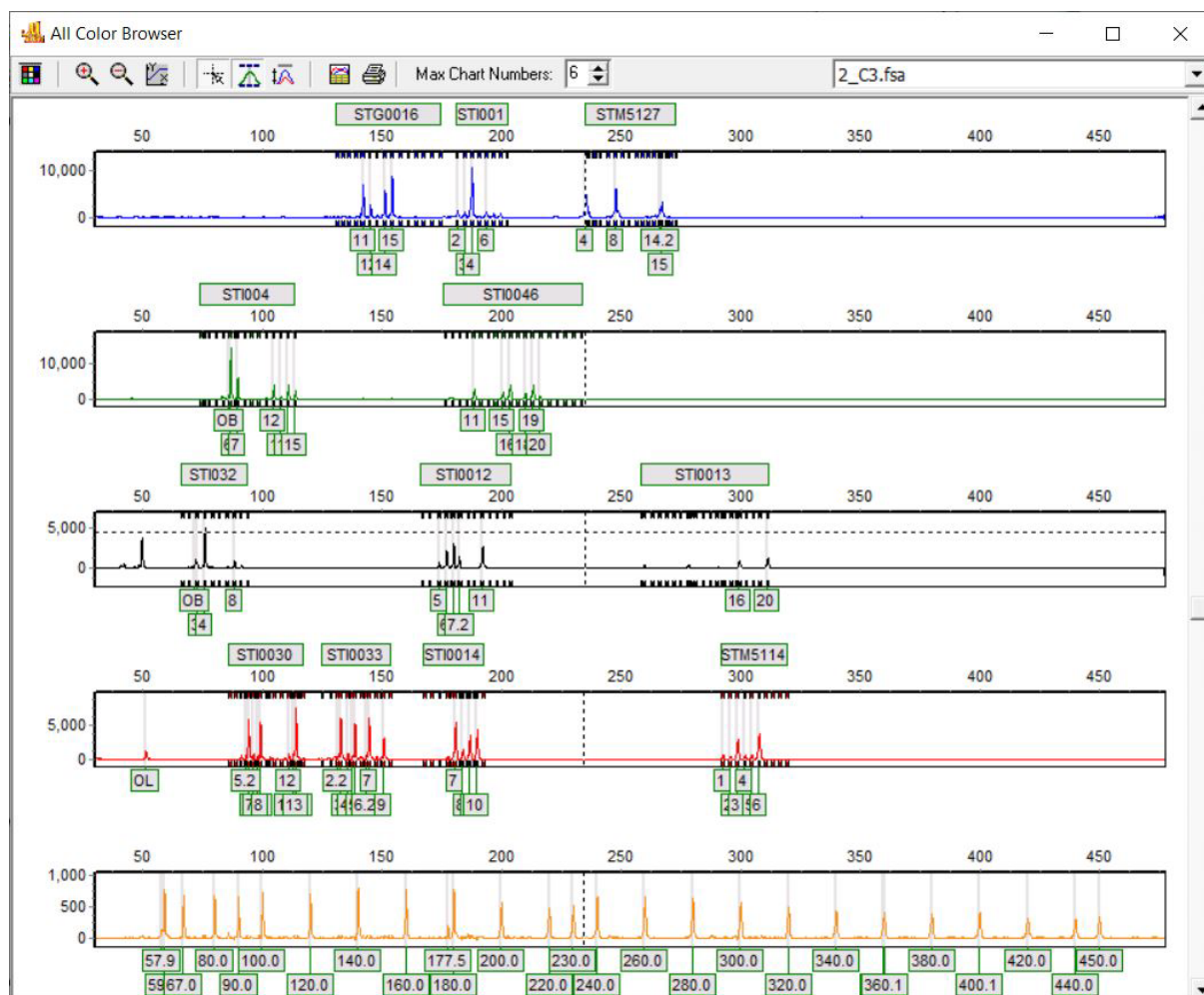
9.6 Анализ отрицательного контрольного образца (ОКО)

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

9.7 Анализ образца

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





10. 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

11. Литература

1. О.Ю. Антонова, Н.А. Швачко, Л.Ю. Новикова, О.Ю. Шувалов, Л.И. Костина, Н.С. Клименко, А.Р. Шувалова, Т.А. Гавриленко. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR –локусов и маркеров R –генов устойчивости. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016; 20(5):596-606
2. Marc Ghislain, Jorge Núñez, María del Rosario Herrera, David M. Spooner. The single Andigenum origin of Neo-Tuberosum potato materials is not supported by microsatellite and plastid marker analyses. Theor Appl Genet (2009) 118:963–969
3. Agim Ballvora, Kerstin Flath, Jens Lu ¨beck, Josef Strahwald, Eckhard Tacke, Hans-Reinhard Hofferbert, Christiane Gebhardt. Multiple alleles for resistance and susceptibility modulate the defense response in the interaction of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) with *Synchytrium endobioticum* pathotypes 1, 2, 6 and 18. Theor Appl Genet (2011) 123:1281–1292
4. S. Feingold, J. Lloyd, N. Norero, M. Bonierbale, J. Lorenzen. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). Theor Appl Genet (2005) 111: 456–466
5. Vishakha Sharma, Madhusudan R. Nandineni. Assessment of genetic diversity among Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) collection using microsatellite and retrotransposon based marker systems. Molecular Phylogenetics and Evolution 73 (2014) 10–17
6. О.С. Колобова, О.П. Малюченко, Т.В. Шалаева, Е.П. Шанина, И.А. Шилов, Я.И. Алексеев, Н.С. Велишаева. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):124-127

ЗАМЕЧАНИЯ И ПОЖЕЛАНИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

[illegible]

