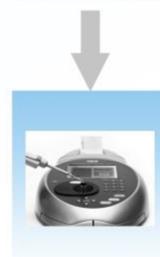


"ГенЭксперт "Картофель"

Руководство Пользователя



Выделение ДНК



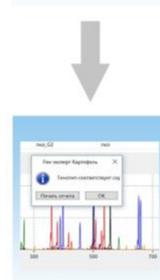
Оценка качества и
количества ДНК



Постановка ПЦР



Проведение
фрагментного
анализа



Автоматическое
определение
сорта по базе
генотипов
картофеля



Итоговый
протокол
исследования

ОГЛАВЛЕНИЕ

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	7
1.4 Необходимые компоненты, не входящие в набор «ГенЭксперт «Картофель»	8
1.5 Условия хранения	8
1.6 Основные характеристики набора	8
1.7 Гарантии качества	9
2. МЕТОДИКА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК	10
3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК	11
4. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ	12
4.1 Аллельная лестница	12
4.2 Положительный контрольный образец	12
5. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ	13
5.1 Постановка реакции	13
5.2 Условия амплификации	14
6. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05	15
6.1 Проведение спектральной калибровки	15
6.2 Проведение капиллярного электрофореза	23
6.2.1 Подготовка и загрузка продуктов амплификации	23
6.2.2 Запуск фрагментного анализа	24
7. АНАЛИЗ ДАННЫХ	31
7.1 Запуск анализа	31
7.2 Создание схемы анализа	35
7.3 Создание стандарта длины	39
7.4 Стандарт длины СД-450	41
7.5 Интерпретация результатов анализа	41
7.6 Формирование протокола исследования	48
8. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	50
9. ЛИТЕРАТУРА	51
ЗАМЕЧАНИЯ И ПОЖЕЛАНИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ	52

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 четвертое 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 растет, 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 объему 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

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 6FAM, 5R6G, 6TAMRA¹, 6ROX². 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 пробирок 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 5 мкл специального раствора (раствор активатора) в каждую пробирку. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 20 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.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах: АНК-32/48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия), GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, MJ Research PTC-100, BioRAD MyCycler, Biometra Tpersonal, Eppendorf Mastercycler. Анализ ПЦР-продуктов проводится с использованием генетического анализатора НАНОФОР 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) или ABI Prism 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

¹ С переносом энергии флуоресценции 5' 6ROX-TTT-TTT-(T-6FAM)-праймер 3'

² С переносом энергии флуоресценции 5' 6TAMRA-TTT-TTT-(T-6FAM)-праймер 3'

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

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

№	Локус	Краситель	Длина	Повтор	Хромосома
1	STG0016	6FAM	108-172	(AGA) _n	I
2	STI0001	6FAM	175-200	(AAT) _n	IV
3	STM5127	6FAM	228-274	(CTT) _n	I
4	STI0004	5R6G	71-114	(AAG) _n	VI
5	STI0046	5R6G	175-231	(GAT) _n	XI
6	STI0032	6TAMRA	74-101	(GGA) _n	V
7	STI0012	6TAMRA	174-213	(ATT) _n	IV
8	STI0013	6TAMRA	263-320	(ACC) _n	III
9	STI0030	6ROX	82-120	(AAT) _n	XII
10	STI0033	6ROX	130-165	(AGG) _n	VII
11	STI0014	6ROX	166-197	(TGG) _n (AGG) _n	IX
12	STM5114	6ROX	294-326	(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

1	Стрипы с реакционными смесями 8 x 0,2 мл	6 стрипов
2	Раствор активатора, 2 шт.	800 мкл
3	Деионизованная вода, 2 шт.	2000 мкл
4	Положительный контрольный образец, 1 шт.	20 реакций
5	Аллельная лестница, 1 шт.	20 нанесений
6	Стандарт длины СД-450, жидкий, 1 шт.	120 нанесений
7	Спектральный калибратор СК-5, жидкий, 1 шт.	120 нанесений

Стрипы с реакционными смесями представляют 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, праймерную смесь 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.

Деионизованная 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 53 флуоресцентно-меченных амплифицированных фрагментов ДНК (рис. 4, стр. 44), 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 (пункт 4.1). 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 компоненты, не входящие в набор «ГенЭксперт «Картофель»»

Для выделения ДНК рекомендуется использовать набор «Сорб-ГМО-Б» («ООО Синтол», каталожный номер GM-503-50).

Бины и панели для программы «ГенЭксперт «Картофель»» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург).

Реагенты и вспомогательное оборудование, не входящие в набор:

Реагент	Производитель	Каталожный номер
Буфер ТАПС	ООО «СИНТОЛ»	БТС-0025
Полимер ПДМА-6	ООО «СИНТОЛ»	ПД-0607
Полимер ПДМА-4	ООО «СИНТОЛ»	ПД-0407
Деионизованный формамид	ООО «СИНТОЛ»	ДИ-ФА
Оборудование	Производитель	Каталожный номер
Центрифуга-вортекс	ООО «НПФ Синтол»	Циклотемп-901
Микроцентрифуга для стрипов	ООО «НПФ Синтол»	Циклотемп-903
Прибор для ПЦР/ПЦР-РВ	ООО «НПФ Синтол»	АНК-32/48
Центрифуга для плашек с охлаждением	Eppendorf	Centrifuge 5810 R

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.

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 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 9.

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» («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, биолюминесцентным 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 $A_{260}/280$ для чистой ДНК должно быть больше 1,8, значение $A_{260}/235$ 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 (красная крышка) 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 (оранжевая крышка) 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. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

5.1 Постановка реакции

Разморозить пробирки с реакционной смесью и исследуемыми образцами. Выдержать 15 минут при комнатной температуре, перемешать на вортексе 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 (10 нг)	1
Деионизированная вода, до конечного объема	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 (рН > 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 60⁰С до 72⁰С. 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 и GeneAmp9700, АВ 2720 ThermalCycler.

Температура	Время	Циклы	Скорость нагрева	Скорость охлаждения
95 °С	3 мин	1	1,5 °С/с	1,5 °С/с
95 °С	10 сек	35	1,0 °С/с	1,5 °С/с
60 °С	40 сек		1,0 °С/с	1,5 °С/с
72 °С*	5 мин	1	1,5 °С/с	1,5 °С/с
4 °С	10 мин	1	1,5 °С/с	1,5 °С/с

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. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05

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.

Анализ продуктов амплификации на генетическом анализаторе возможен только после проведения спектральной калибровки с 5-ти цветным калибратором СК-5. Спектральный калибратор содержит смесь из 5 фрагментов ДНК разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями (FAM, R6G, TAMRA, ROX, Sy660). Эти красители использованы в наборе «ГенЭксперт «Картофель» (FAM, R6G, TAMRA, ROX) и в размерном стандарте СД-450 (Sy660).

Подготовка рабочего раствора спектрального калибратора:

Приготовить рабочий раствор для проведения спектральной калибровки.

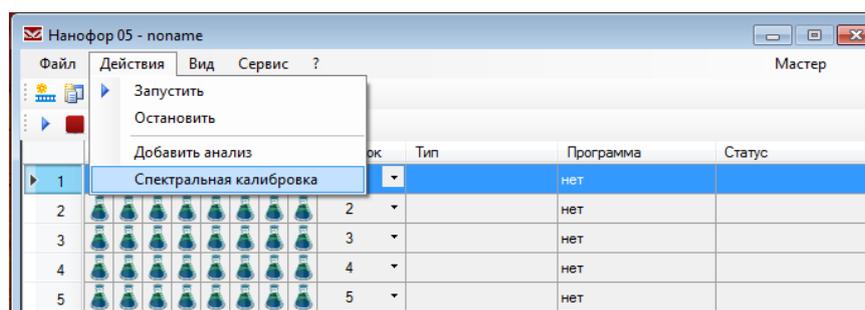
Компонент	На один ряд план
ДИ-формаид	80 мкл
Раствор СК-5	4 мкл

Добавить по 10 мкл рабочего раствора в лунки одного ряда 96-луночного планшета или в стрипованные пробирки (возможно нанесение в любой ряд планшета). При необходимости удалить пузыри со дна лунок (пробирок) коротким центрифугированием на микроцентрифуге Циклотемп-903 (для стрипов) или Eppendorf Centrifuge 5810 R (для плашек).

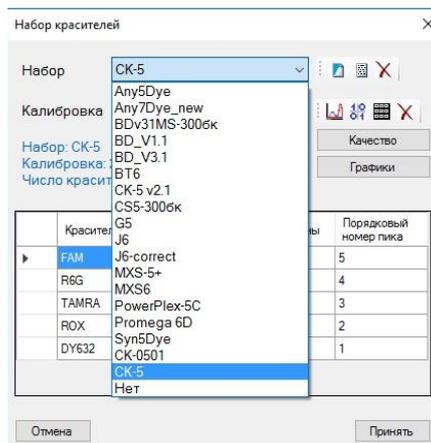
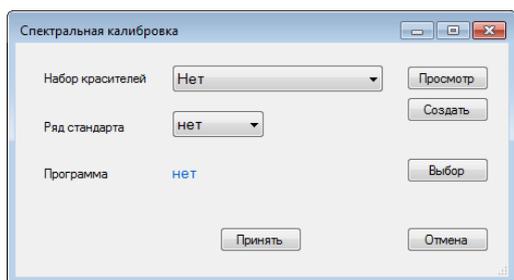
Спектральная калибровка:

Шаг А Описание плашки для спектральной калибровки

В главном окне программы Нанофор 05 в меню Действия выбрать опцию Спектральная калибровка.



В появившемся окне Спектральная калибровка в строке Набор красителей выбрать СК-5.



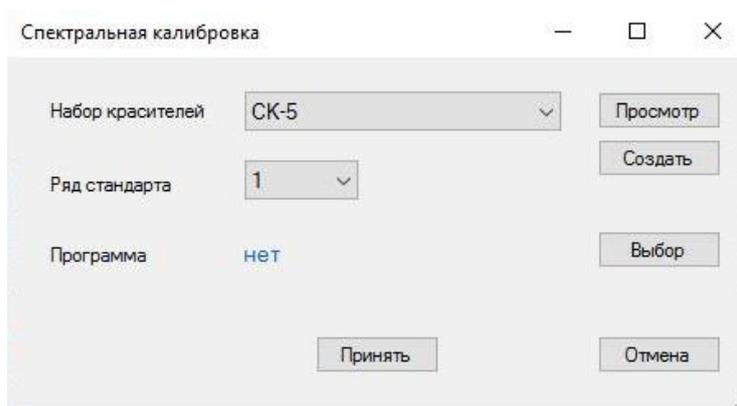
Если название набора красителей в списке отсутствует, то необходимо создать новый набор, нажав кнопку Создать. Появится окно Создание набора красителей, в котором необходимо заполнить все поля. В строке Имя набора указать СК-5. Число красителей — 5. Заполнить таблицу Свойства следующим образом:

№	Название красителя	Цвет	Длина волны	Порядок
1	FAM	синий	520	5
2	R6G	зеленый	550	4
3	TMR	черный	580	3
4	ROX	красный	605	2
5	Sy660	оранжевый	660	1

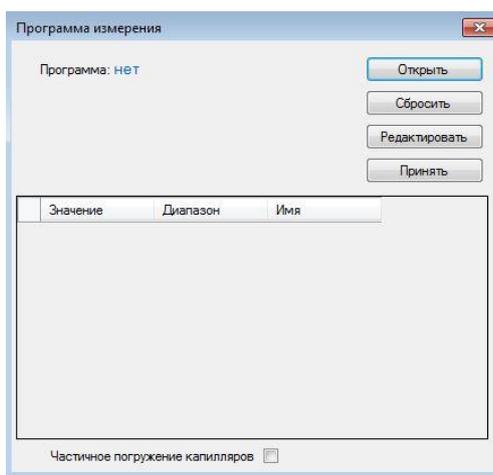
Важно! В таблице выделены столбцы с обязательной информацией! При неправильном вводе Порядка выхода красителей спектральная калибровка будет ошибочной!

После заполнения всех полей нажать кнопку Сохранить.

Во вновь появившемся окне Спектральная калибровка в строке Ряд стандарта выбрать номер ряда, в котором находятся пробирки с раствором спектрального калибратора (стандарт может находиться в любом ряду планшета), затем нажать кнопку Выбор.

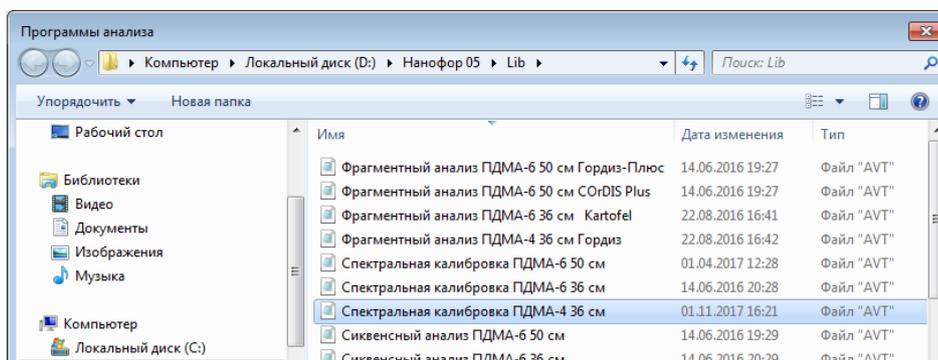


В открывшемся окне Программа измерения нажать кнопку Открыть.



Важно! Обратите внимание на длину капилляров (36 или 50 см) и тип полимера, установленных в приборе на момент анализа.

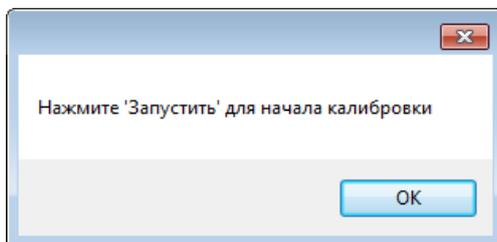
В открывшемся окне Программы анализа в папке *D:\НАНОФОР 05\Lib* выбрать программу измерений (например, *Спектральная калибровка 36 см ПДМА-4.avt*), соответствующую длине установленных капилляров (36 см) и используемому типу полимера (ПДМА-4), и нажать кнопку Принять.



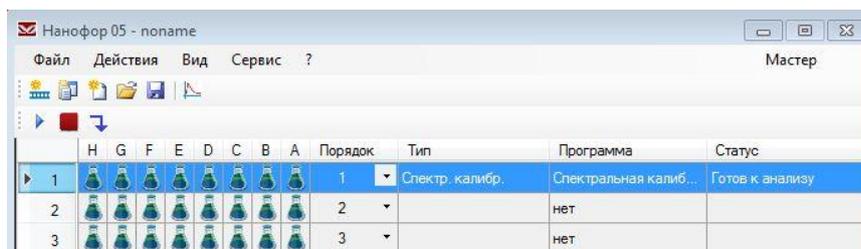
Рекомендуемые параметры программы спектральной калибровки зависят от длины капилляров и типа полимера:

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]	45	45	45	45
Напряжение префореза [В]	15000	15000	15000	15000
Время префореза [сек]	180	180	180	180
Напряжение ввода пробы [В]	2400	2400	2400	2400
Время ввода пробы [сек]	3	3	3	3
Напряжение электрофореза [В]	15000	15000	15000	15000
Время электрофореза [сек]	1100	1400	1700	2200
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	800	900	1200	1200
Длит. шага высокого при фореze [сек]	40	40	40	40
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	1000	1000	1000	1000
Число шагов после фореze	30	30	30	30
=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

В окне Спектральная калибровка нажать кнопку Принять. В появившемся окне нажать ОК.

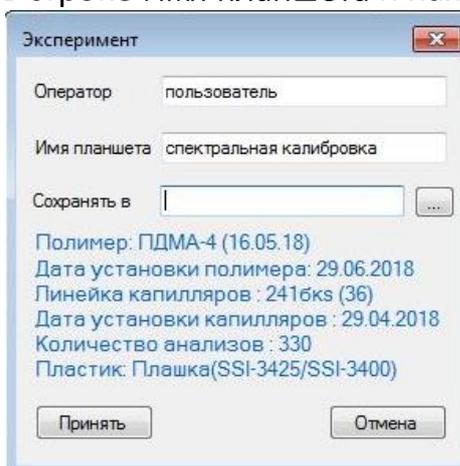


Активируется главное окно программы Нанофор 05. В графе Тип появится надпись типа анализа (Спектр. калибр.), в графе Программа — название программы анализа Спектральная калибровка ПДМА-4 36 см, а в графе Статус в выбранном ряду плашки появится надпись Готов к анализу.

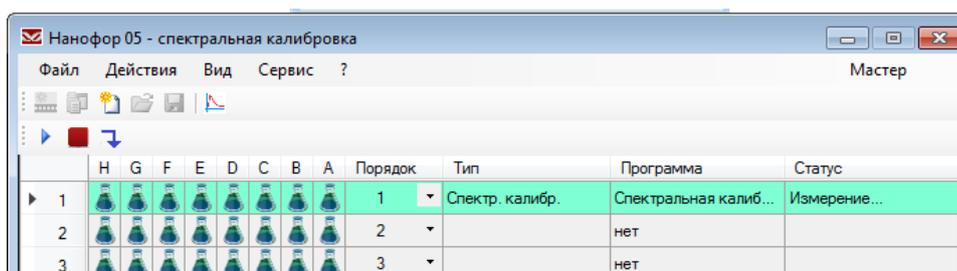


Шаг Б Проведение спектральной калибровки

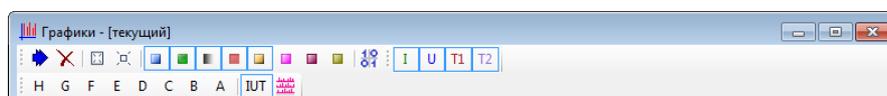
Для запуска спектральной калибровки в меню главного окна программы Нанофор 05 нажать кнопку Запустить или в меню Действия выбрать опцию Запустить. В появившемся окне Эксперимент задать имя оператора в строке Оператор, название планшета в строке Имя планшета и нажать кнопку Принять.



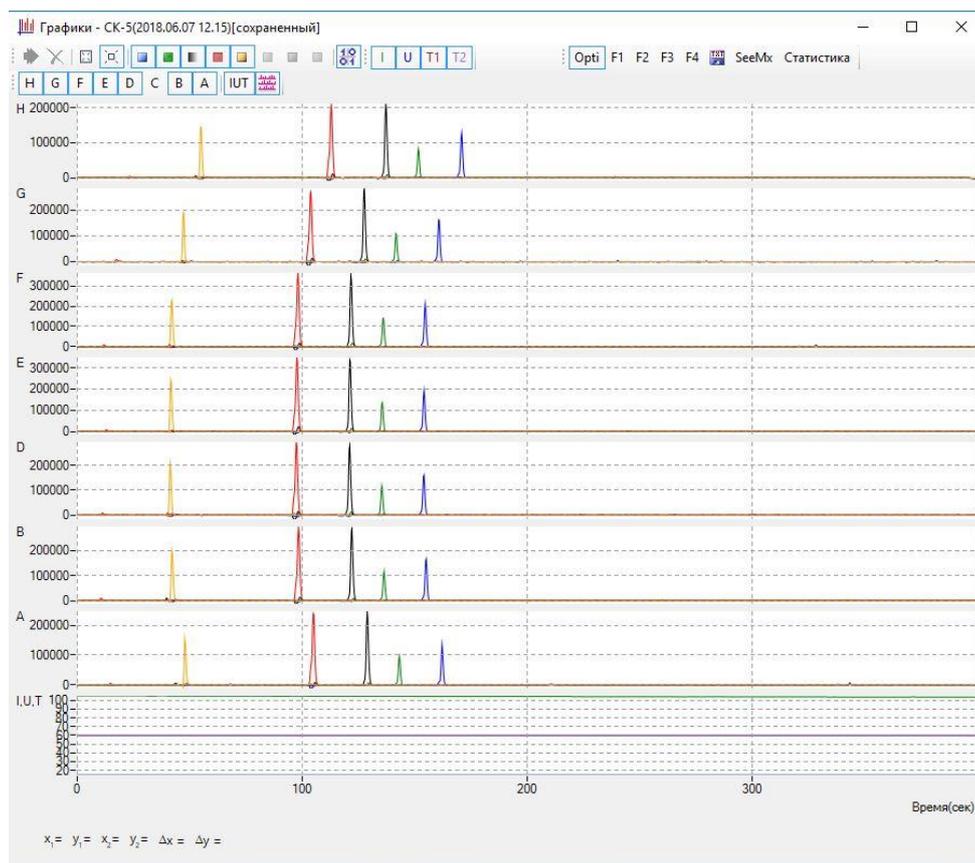
Анализируемый ряд плашки со спектральным калибратором выделится зеленым цветом, в графе Статус появится надпись Измерение.



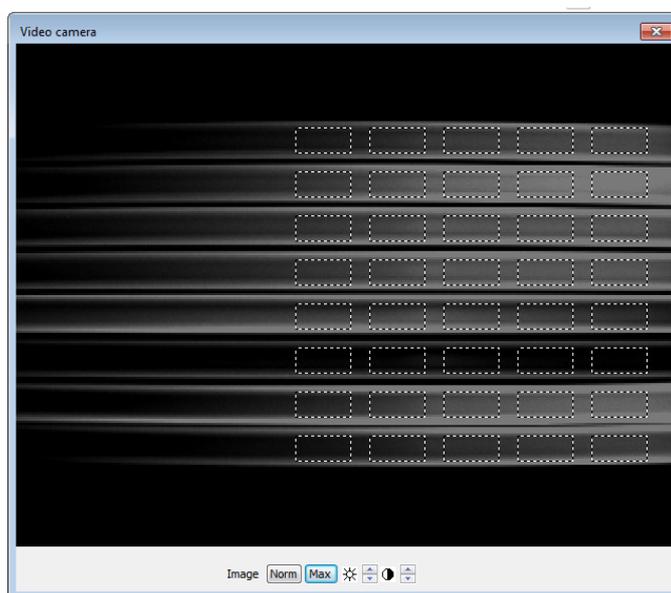
В ходе выполнения программы калибровки в окне Графики, вызываемом нажатием кнопки в меню главного окна программы Нанофор 05, можно осуществлять просмотр данных с каналов флуоресценции по каждому капилляру (кнопки Н...А), а также значения тока (I), напряжения (U), температуры внутри термостатируемой кассеты (T1) и температуры термостатируемого детектора (T2), нажав кнопку IUT.



Активировав кнопку , можно просмотреть сигналы флуоресценции в нескольких капиллярах, а также значения I, U, T1 и T2.

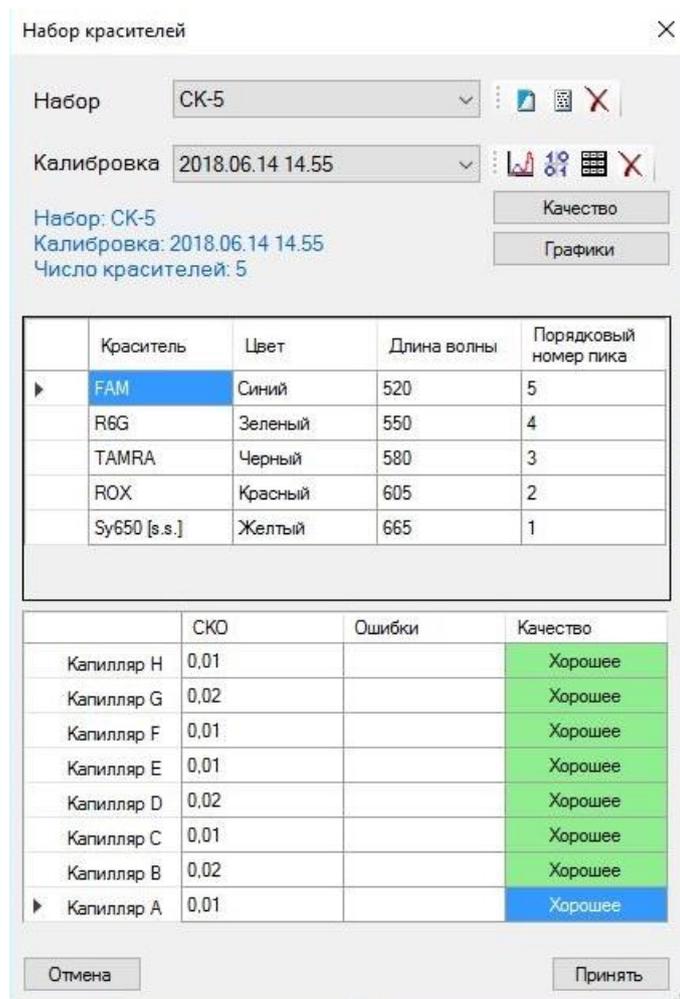


Одновременно можно наблюдать сигнал флуоресценции во всех капиллярах на изображении с видеокамеры, для чего необходимо в главном окне программы Нанофор 05 в меню Сервис выбрать опцию Камера ПЗС.



Шаг В Оценка результатов спектральной калибровки

После завершения программы измерений данные анализируются автоматически. В результате появится окно Набор красителей с рассчитанными оценками качества спектральной калибровки по каждому капилляру. Возможны три варианта оценки качества: Хорошее, Удовлетворит. и Плохое. В последнем случае калибровку рекомендуется переставить.



Для капилляров с оценкой качества спектральной калибровки Удовлетворит. или Плохо провести повторно спектральную калибровку, отредактировав параметры электрофореза (например, увеличить напряжение и время инъекции, изменить время электрофореза и время исключения).

Если после этого в окне Набор красителей качество калибровки для всех капилляров установится Хорошее, нажать кнопку Принять. Калибровка сохранится под заданным в строке Набор названием и со временем ее проведения в формате год. месяц. число. час. минута начала калибровки.

При использовании СК-0501 в качестве спектрального калибратора, в окне Графики, при нажатой кнопке  (Применить матрицу), должна отображаться следующая последовательность пиков (слева направо): оранжевый-красный-черный-зеленый-синий.

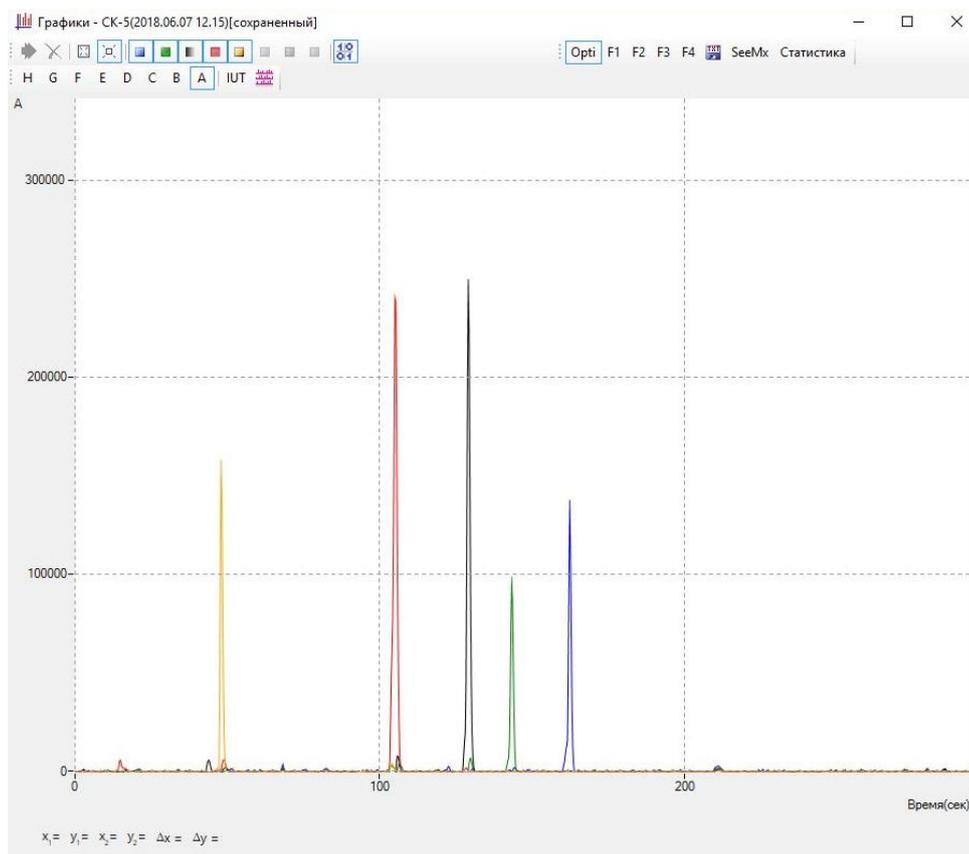


Рисунок 1. Электрофореграмма разделения спектрального калибратора СК-5

6.2 Проведение капиллярного электрофореза

Для получения полного STR-профиля проводится фрагментный анализ - электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора «ГенЭксперт «Картофель»».

6.2.1 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Перед загрузкой образцов в генетический анализатор НАНОФОР 05 необходимо приготовить смесь HiDi-формамида и размерного стандарта СД-450 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на 1 образец, мкл
HiDi-формаимид	10
Стандарт длины СД-450	1

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.

После перемешивания добавить по 10 мкл смеси в каждую лунку плашки/стрипа. Затем внести в смесь по 1 мкл ПЦР-продукта. В отдельную лунку внести 1 мкл раствора аллельной лестницы. Готовую смесь перемешать на вортексе и центрифугировать (пузыри со дна лунок должны быть удалены).

Денатурировать образцы 5 мин при 95°C.

Важно! 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 формамида.

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

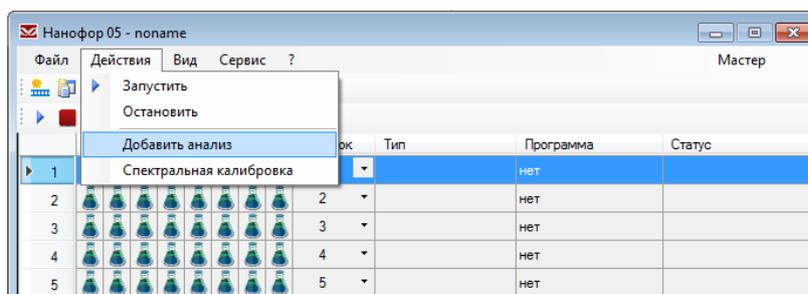
6.2.2 Запуск фрагментного анализа

Проведение капиллярного электрофореза на приборе НАНОФОР 05 проводится в соответствии с Руководством пользователя, предоставляемым производителем. Для получения корректных результатов анализа необходимо сначала провести соответствующую спектральную калибровку (пункт 7.1), затем провести фрагментный анализ, используя соответствующую программу измерений. После окончания фореза проанализировать полученные данные.

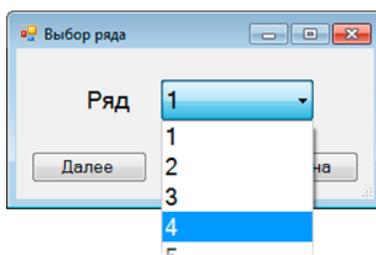
Шаг А Описание плашки

Перед началом анализа следует описать расположение образцов в плашке и ввести другую необходимую информацию (имя образца, тип образца, схема анализа, набор красителей, стандарт длины).

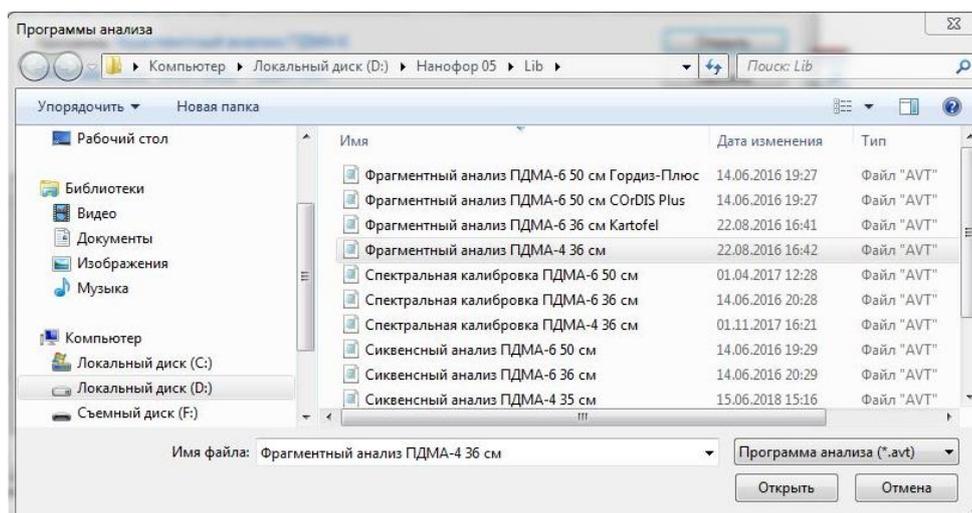
В меню Действия выбрать опцию Добавить анализ.



В окне Выбор ряда выбрать ряд плашки, в который загружены пробирки с образцами для анализа и нажать кнопку Далее.



В открывшемся окне Программа измерений нажать кнопку Открыть и в папке D:\НАНОФОР 05\Lib выбрать программу анализа (например, для полимера ПДМА-4 и капилляров длиной 36 см, нужно выбрать Фрагментный анализ ПДМА-4 36 см .avt).



Важно! Обратите внимание на длину капилляров (36 или 50 см) и тип полимера, установленных в приборе на момент анализа.

Эти данные можно просмотреть, нажав кнопку  в главном окне программы Нанофор 05.

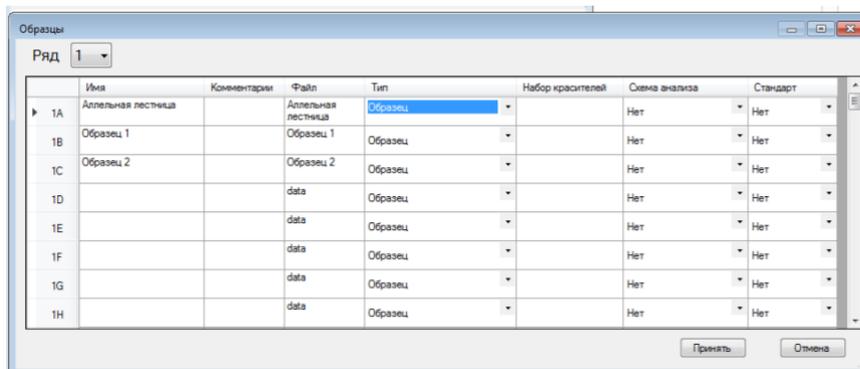
Нажать кнопку Принять.

Рекомендуемые параметры программы анализа 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]	45	45	45	45
Напряжение префореза [В]	15000	15000	15000	15000
Время префореза [сек]	180	180	180	180
Напряжение ввода пробы [В]	2400	2400	2400	2400
Время ввода пробы [сек]	3	3	3	3
Напряжение электрофореза [В]	10500	10500	10500	10500
Время электрофореза [сек]	1700	2400	2800	3900
Время исключения регистрации электрофореза [сек]	750	1000	1450	1600
Длит. шага высокого при форезе [сек]	40	40	40	40
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	1000	1000	1000	1000
Число шагов после фореза	30	30	30	30

=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

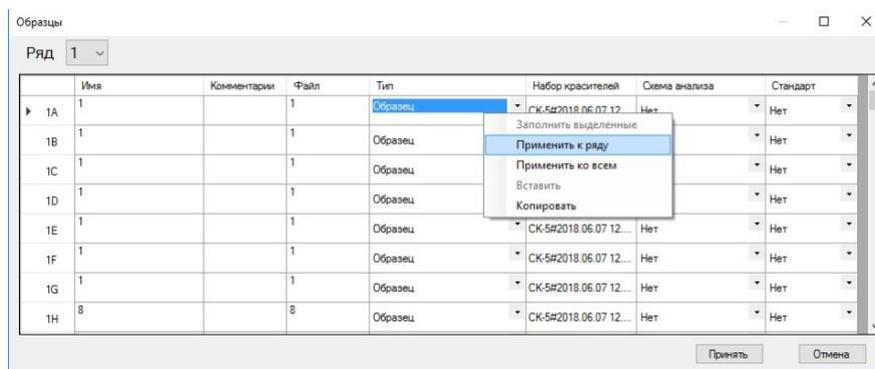
В окне Образцы заполнить таблицу. Буква в начале каждой строки таблицы соответствует положению образца в выбранном ряду плашки.



Важно! Обратите внимание на расположение рядов в плашке — нумерация рядов плашки 1–12 сверху вниз!

- а) В графе Имя вводится название или порядковый номер образца (необходимо ввести названия всех образцов; для лунок, не содержащих образцы, рекомендуется поставить прочерк).
- б) Автоматически в графе Файл названию файла присваивается введенное имя образца.
- в) В графе Тип выбрать из списка тип образца: Образец, Положительный контроль, Отрицательный контроль, Аллельная лестница.

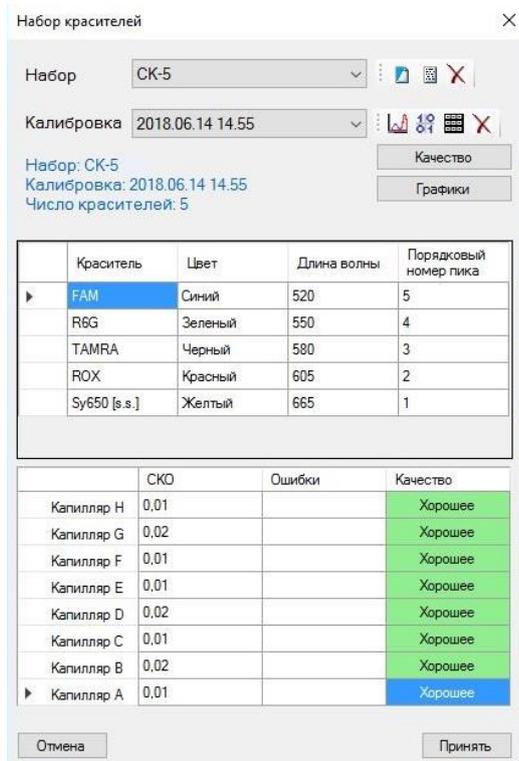
Если выбираемый параметр одинаков для всех пробирок описываемого ряда плашки, то для ускорения заполнения таблицы можно выбрать опцию Применить к ряду. Для выбора этой опции, после ввода параметра образца, следует перевести курсор в ячейку ниже, нажать левую кнопку мыши, а затем правой кнопкой нажать на верхнюю ячейку с уже установленным параметром. В открывшемся окне выбрать пункт Применить к ряду. Автоматически заполнятся все строки столбца данного ряда.



В случае, когда во всех рядах плашки загружен один и тот же тип образца, следует воспользоваться опцией Применить ко всем. Заданный тип образца автоматически будет применен ко всем образцам плашки.

Аналогично заполняются все столбцы таблицы.

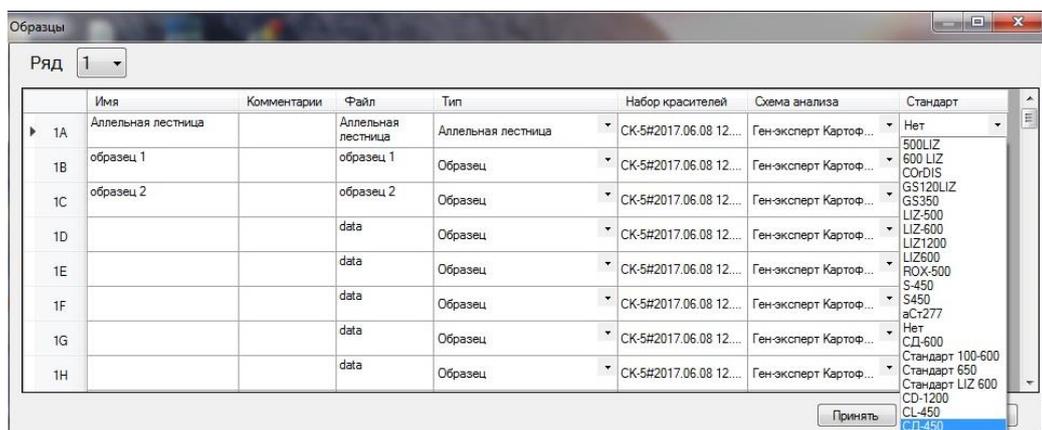
- г) В графе Набор красителей выбрать спектральную калибровку соответствующую используемому набору и установленной линейке капилляров. Для этого навести указатель мыши на любую ячейку в графе Красители и двойным нажатием на левую кнопку мыши открыть окно Набор красителей. Выбрать в нем необходимую калибровку (например, СК-5 #2018.06...), проверить качество (должно быть Хорошее) и нажать кнопку Принять.



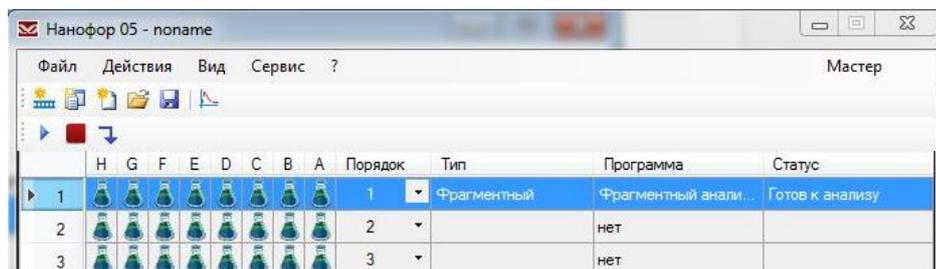
- д) В графе Схема анализа выбрать метод анализа – «ГенЭксперт «Картофель»»

- е) В графе Стандарт выбрать СД-450.

Пример заполненной таблицы для ряда 1 приведен ниже:



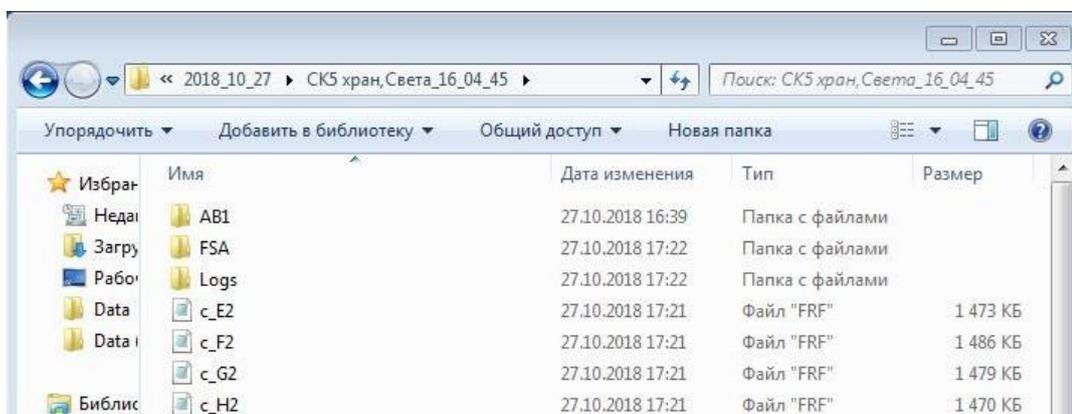
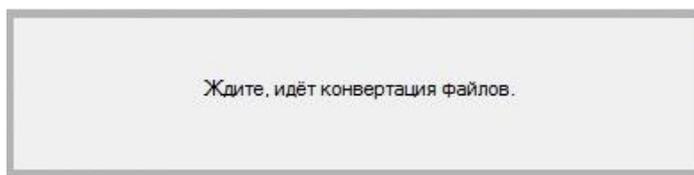
После заполнения всех столбцов для выбранного ряда нажать кнопку Принять. Откроется главное окно программы Нанофор 05 и в графе Статус в выбранном ряду плашки появится надпись Готов к анализу.



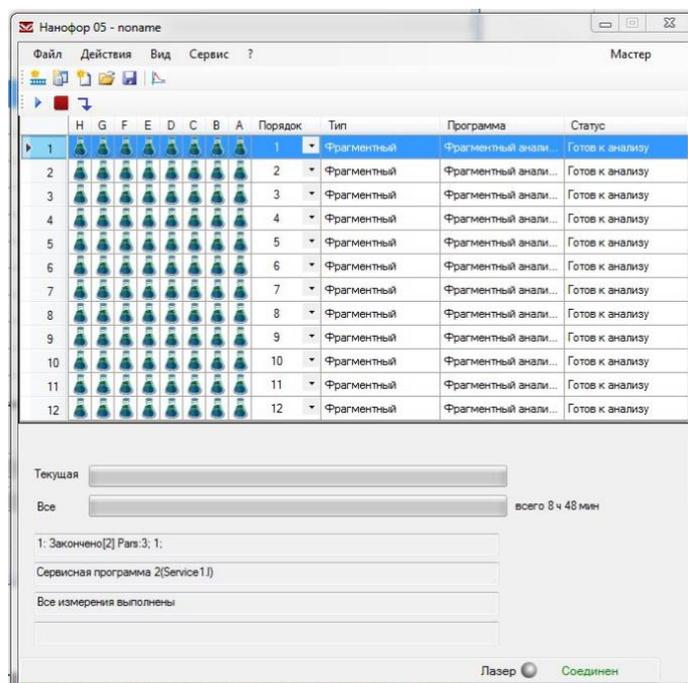
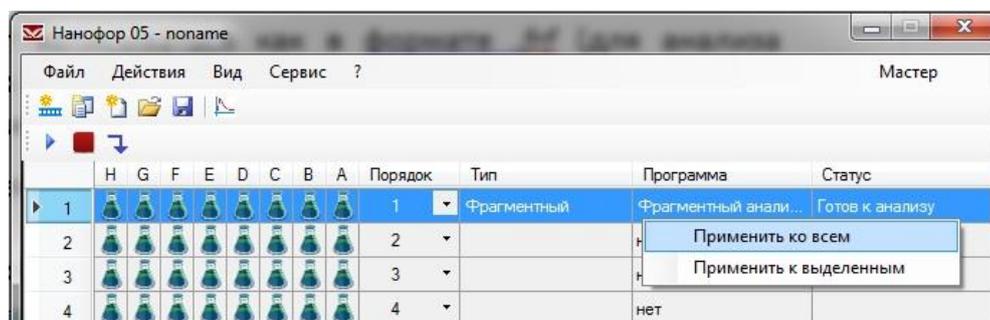
Для описания всей плашки (или ее части) требуется снова выбрать опцию Добавить анализ и повторить все описанные выше действия последовательно с каждым рядом плашки, заполненным образцами для анализа.

В описание планшета можно импортировать данные, экспортированные из лабораторной информационной системы (ЛИС), а также из приборов НАНОФОР 05 или ABI Prism. Для этого в меню Файл выбрать Импорт → Описание планшета. При этом будут импортированы только названия образцов (графы Имя и Файл), остальные столбцы (Тип, Набор красителей, Схема анализа, Стандарт) следует заполнить, как описано выше.

Полученные на приборе НАНОФОР 05 данные будут записываться как в формате *.frf* (для анализа программой ДНК ФА), так и в формате *.fsa* (для анализа с помощью другого программного обеспечения). Программа Нанофор05 автоматически конвертирует данные в формат *.fsa* (данные находятся в папке FSA, формируемой в папке с данными).

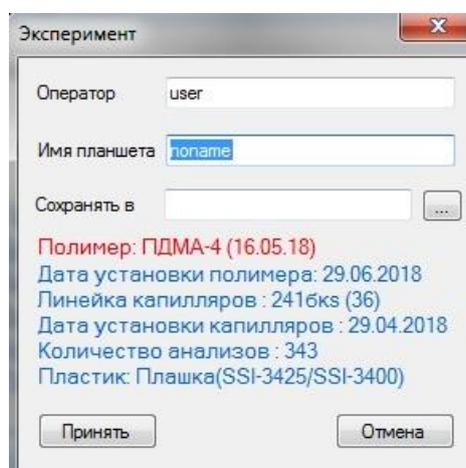


Если для анализа всех рядов плашки будет использоваться одна и та же программа, следует нажать правой кнопкой мыши на ячейку с уже заданной программой и выбрать Применить ко всем.



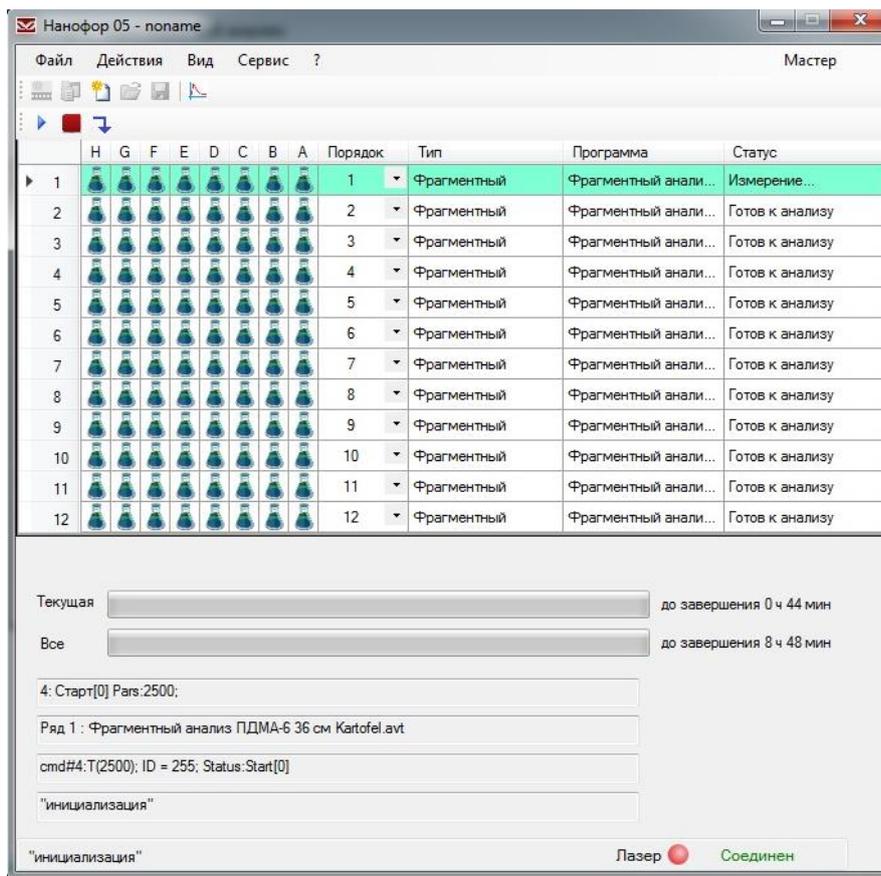
Шаг Б Запуск анализа

- 1) После описания всех загруженных образцами рядов плашки, в меню главного окна программы Nanoфор 05 нажать кнопку ▶ Запустить или в меню Действия выбрать опцию Запустить.
- 2) В открывшемся окне заполнить поля Оператор и Имя планшета.



- 3) Нажать кнопку Принять. Активируется главное окно программы Nanoфор 05. Первый анализируемый ряд плашки выделится зеленым цветом, а в графе статус должна появиться надпись Измерение. В нижней части окна рядом с надписью Лазер серый кружок должен стать красным — это означает, что лазер

включен. В конце строки Текущая отобразится время до конца текущего анализа, а в конце строки Все — время до конца анализа всей плашки.



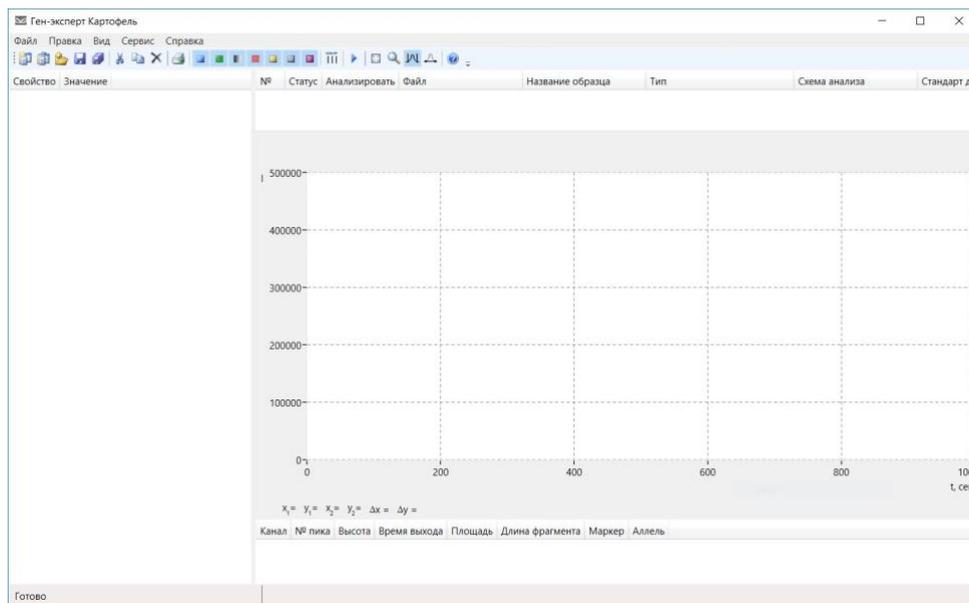
В ходе выполнения фрагментного анализа в окне Графики, вызываемом нажатием кнопки  в меню главного окна программы Нанофор 05, можно осуществлять просмотр данных с каналов флуоресценции  по каждому капилляру (кнопки Н...А), а также значения тока (I), напряжения (U), температуры внутри термостатируемой кассеты (T1) и температуры термостатируемого детектора (T2), нажав . Активировав кнопку , можно просмотреть сигналы флуоресценции в нескольких капиллярах, а также значения I, U, T1 и T2.

7. АНАЛИЗ ДАННЫХ

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

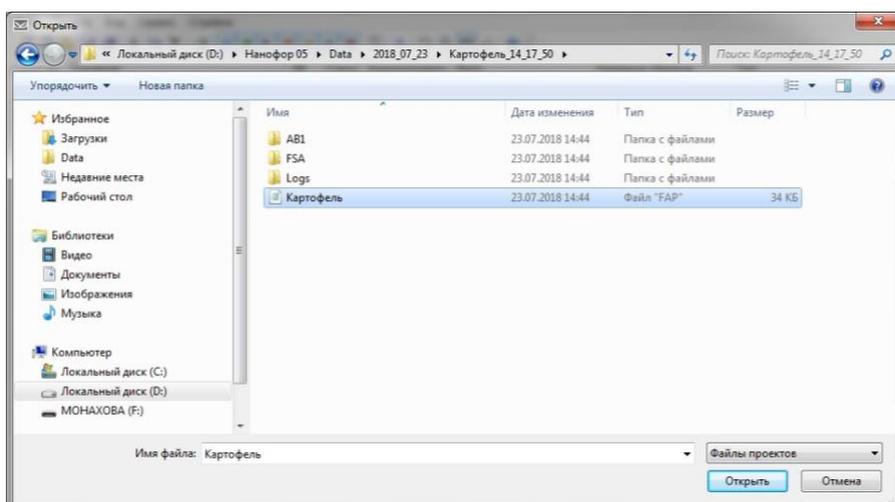
7.1 Запуск анализа

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

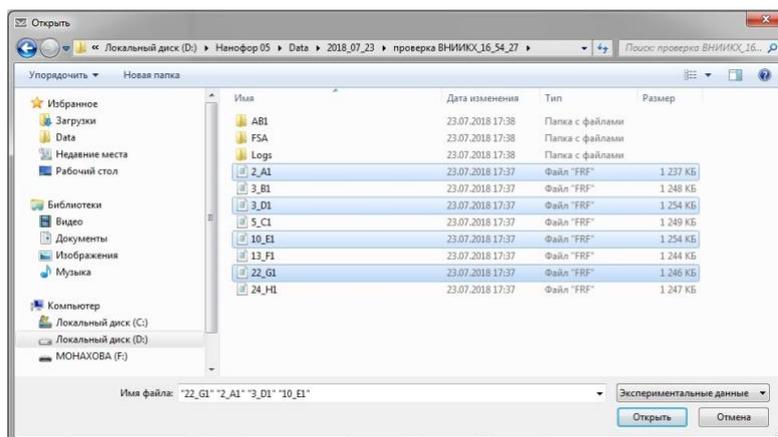


Образцы для анализа могут быть добавлены двумя способами:

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 ABIPrism, имеющих расширение *.fsa* и *.hid*. Открыть такие файлы для анализа можно аналогично, с помощью опции Добавить файлы (или нажав кнопку .



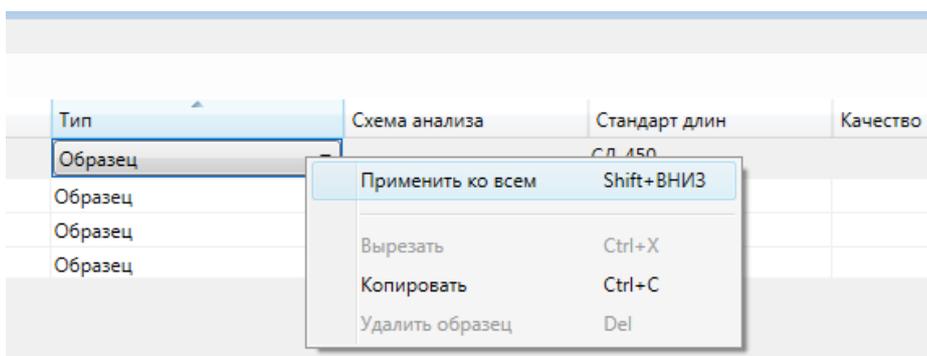
Перед проведением анализа необходимо убедиться, что для каждого образца заданы все необходимые параметры, а именно, Тип, Схема анализа, Стандарт длин. Как правило, все эти параметры уже введены в программе Нанофор 05 при описании плашки (пункт 7.2.2).

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.

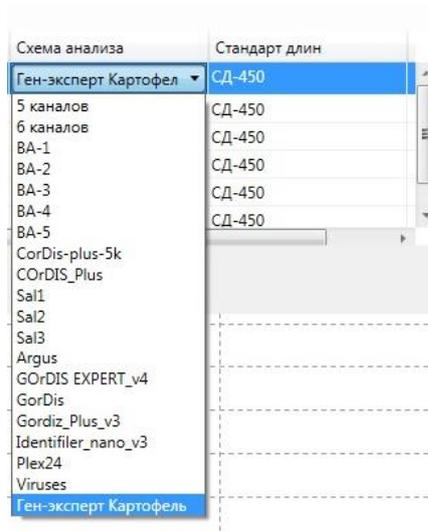
№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин
1	Готов к анализу	<input checked="" type="checkbox"/>	1_A10	1	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450
2	Готов к анализу	<input checked="" type="checkbox"/>	2_A1	2	Нет	Ген-эксперт Картофель	СД-450
3	Готов к анализу	<input checked="" type="checkbox"/>	3_B1	3	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450
4	Готов к анализу	<input checked="" type="checkbox"/>	5_C1	5	Положительный контроль	Ген-эксперт Картофель	СД-450
5	Готов к анализу	<input checked="" type="checkbox"/>	6_D1	6	Отрицательный контроль	Ген-эксперт Картофель	СД-450
6	Готов к анализу	<input checked="" type="checkbox"/>	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).



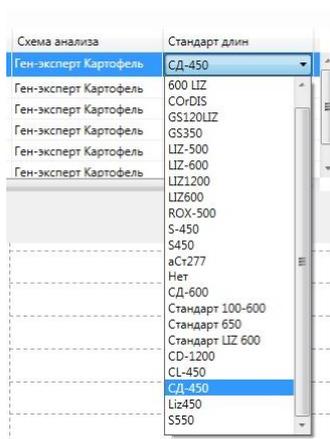
Важно! Среди всех анализируемых образцов хотя бы один образец должен быть с типом Аллельная лестница.

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.

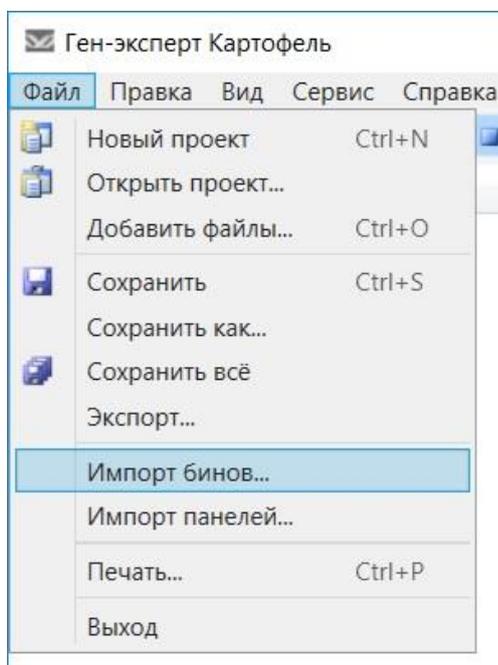
Нажать кнопку ▶ Запустить анализ, которая находится на панели инструментов основного окна программы «ГенЭксперт «Картофель»». Процесс выполнения анализа отображается на индикаторе  в строке состояния в нижнем левом углу окна. После завершения анализа появляется надпись Готово.

7.2 Создание схемы анализа

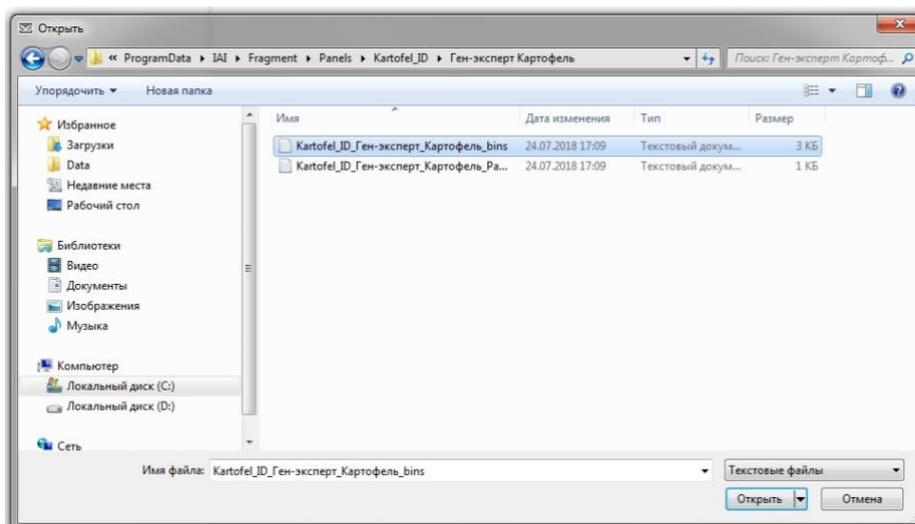
Для изменения/создания параметров в программе, перейти в режим Эксперта (Пароль - Expert2).

Шаг А Импорт бинов

Перейти Файл → Импорт бинов.



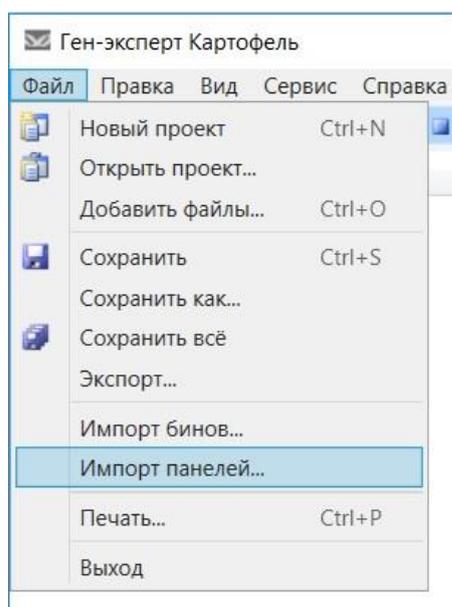
Выбрать в папке *C:\ProgramData\IAI\Fragment\Panels\Kartofel_ID*. файл с актуальными биномы (предоставляет разработчик программного обеспечения ИАП РАН).



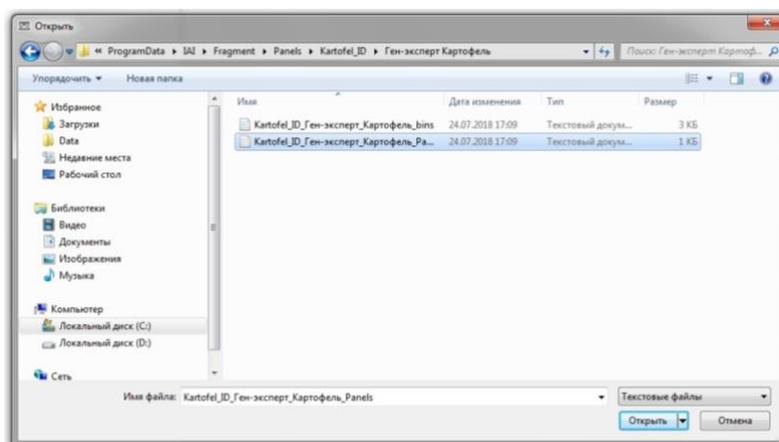
Если в папке отсутствует файл, запросить его у производителя наборов, скопировать в указанную папку и выбрать через опцию Импорт бинов.

Шаг Б Импорт панелей

Перейти Файл → Импорт панелей.

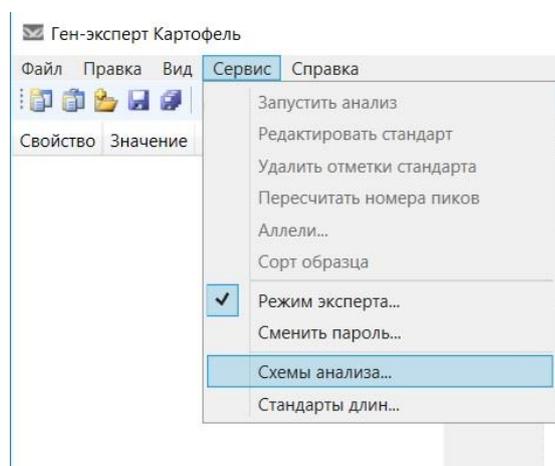


Импортировать панели аналогично импорту бинов.

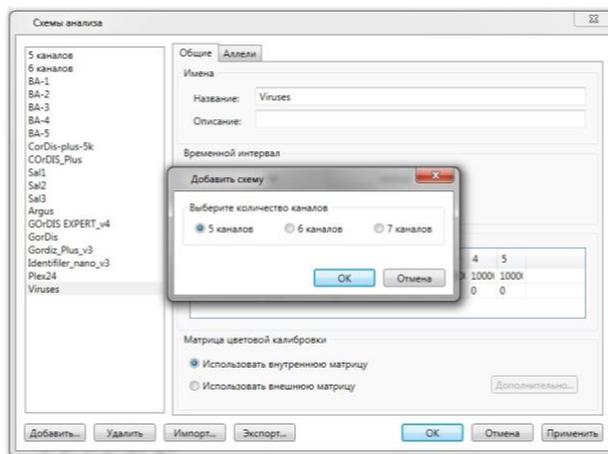


Шаг В Создание схемы

Перейти Сервис → Схемы анализа.



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

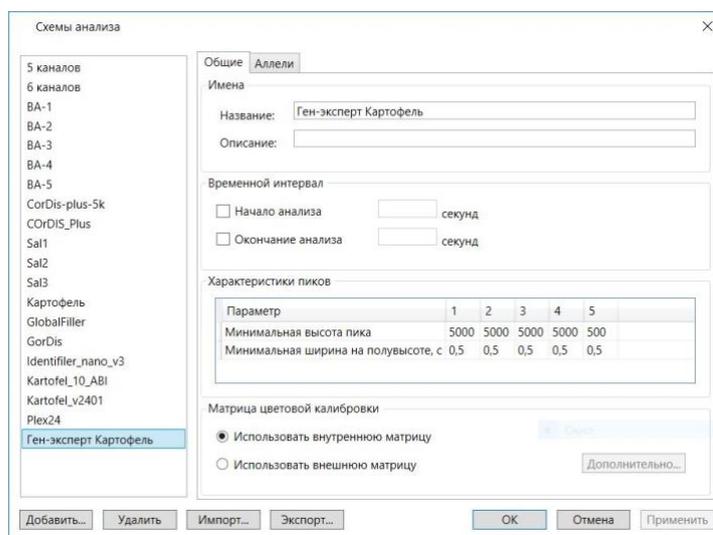


Во вкладке **Общие** исправить появившееся **Название** на «ГенЭксперт «Картофель», в таблице **Характеристика пиков** установить рекомендованные производителем набора значения, и убедиться, что маркер матрицы цветовой калибровки активирован для использования внутренней матрицы.

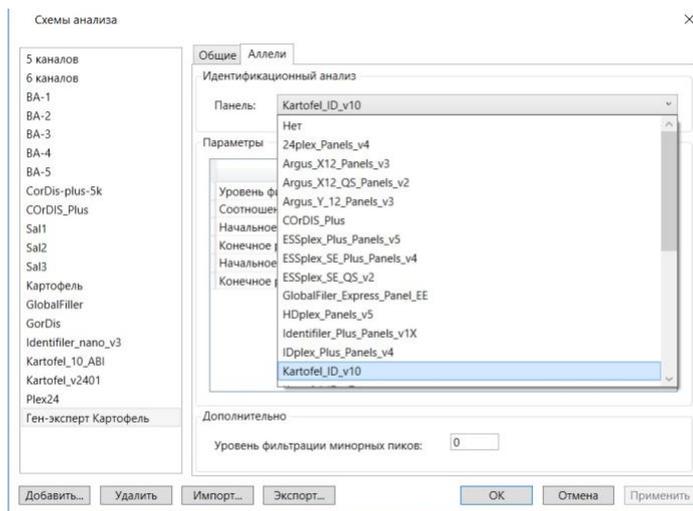
Минимальная высота пика по каналам:

1 – 5000; 2 – 5000; 3 – 5000; 4 – 5000; 5 - 500

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



Во вкладке **Алели** развернуть список **Панель** и выбрать **Kartofel_ID_v10**.

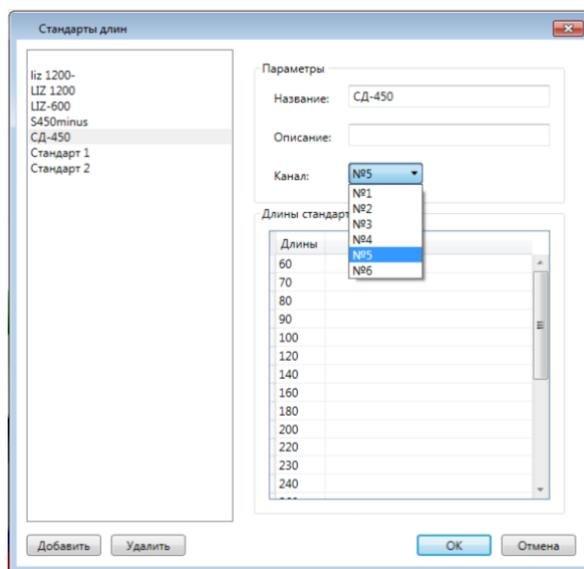
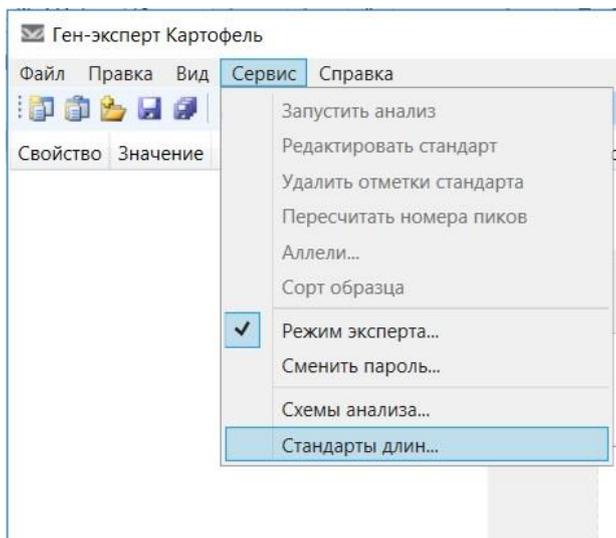


В таблице Параметры установить все значения равными 0 и нажать ОК.

	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

7.3 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	
...	

7.4 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.

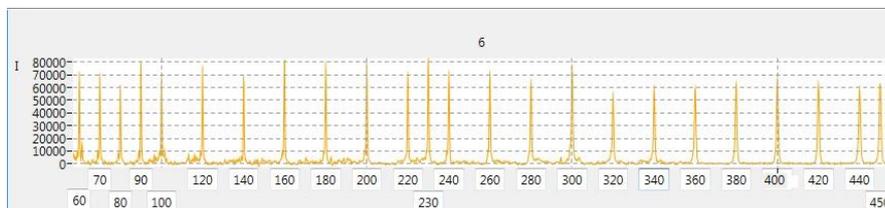


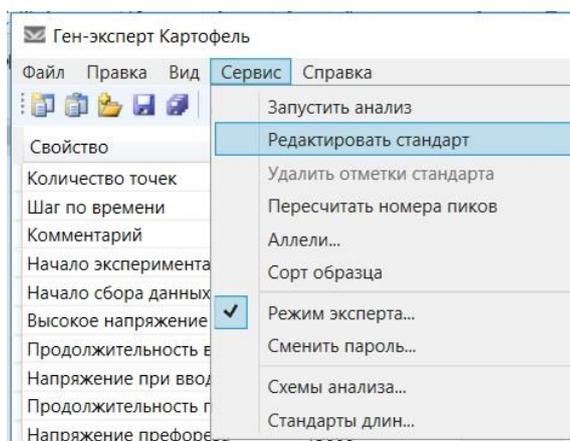
Рисунок 2. Электрофореграмма разделения стандарта длины СД-450

7.5 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 ([пункт 7.2](#)). 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.

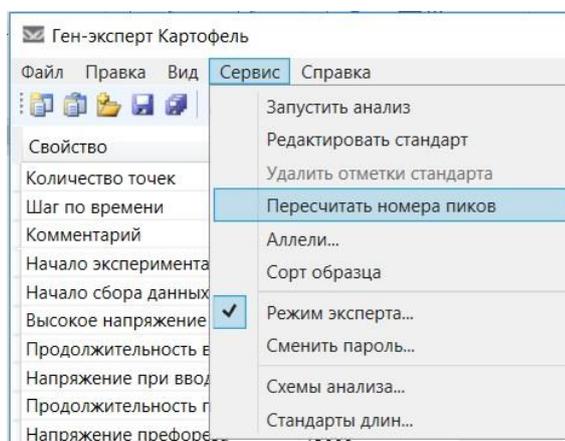


- 3) Ввести в столбце Длина фрагмента значения, соответствующие пикам стандарта длин, и каждый из них отметить как Пик стандарта.

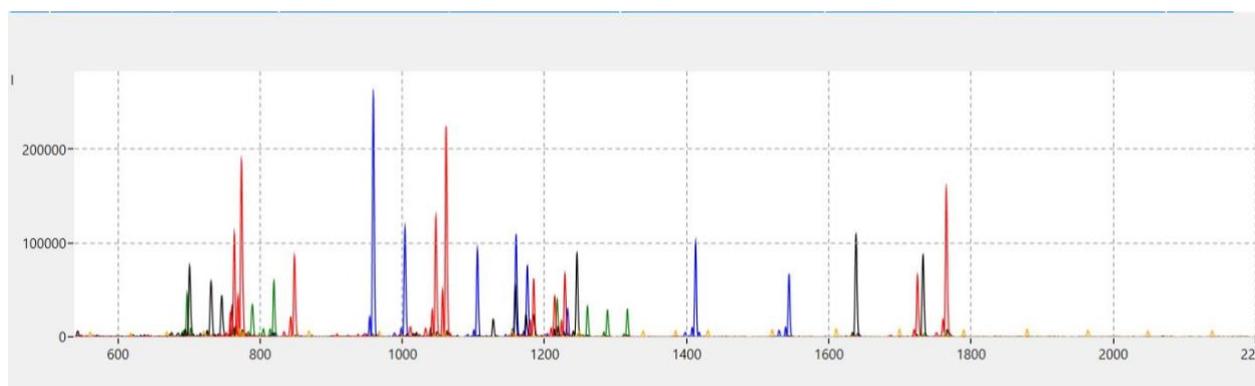
На Ти Ог	Канал	№ пика	Высота	Время выхода	Ширина на полувысоте	Длина фрагмента	Пик стандарта	Маркер	Аллель	Качество
	5	673	997	1608,6	1,11	0,0	<input type="checkbox"/>			Хорошее
	5	674	8927	1621,4	2,57	360,0	<input type="checkbox"/>			Хорошее
	5	675	979	1648,5	0,72	0,0	<input type="checkbox"/>			Хорошее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

Готово

4) Перейти Сервис → Пересчитать номера пиков.



Пример результата анализа с оценкой качества *Хорошее* приведен на рисунке 3 и в таблице 2:



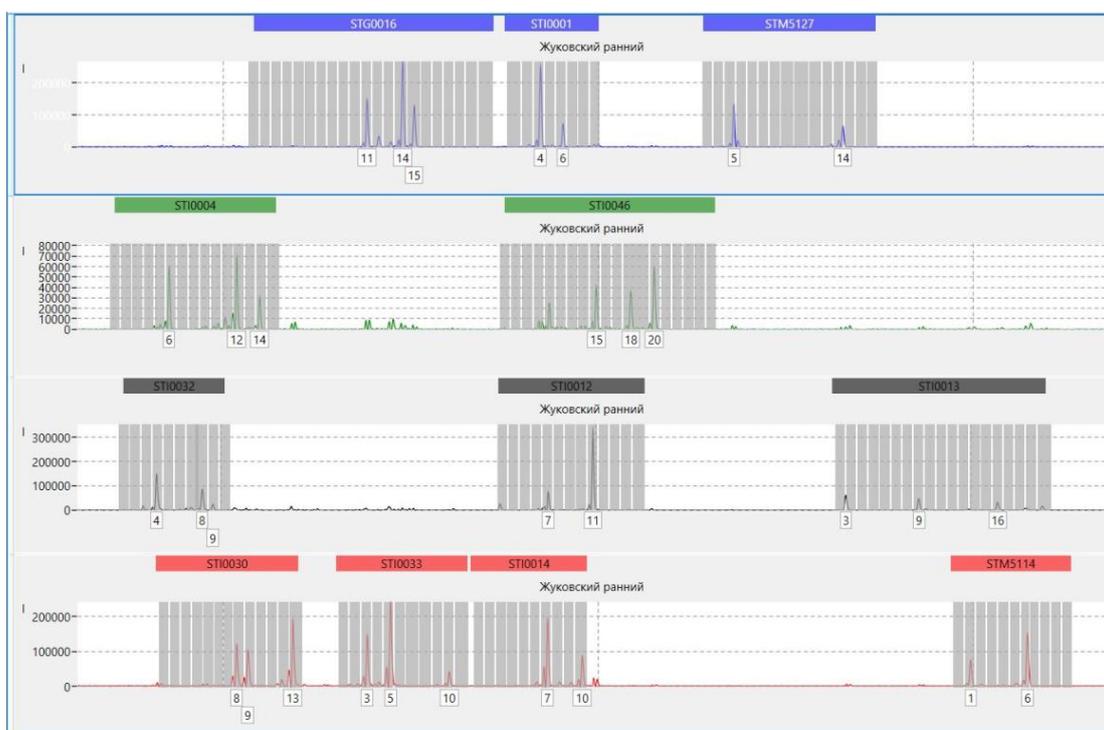


Рисунок 3. Образец с оценкой качества *Хорошее*

Таблица 2. Раскладка аллелей проанализированного образца с оценкой качества *Хорошее*.

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	<input type="checkbox"/>	17_C1	17	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
17	Готов к анализу	<input type="checkbox"/>	17-3107-1_G1	17-3107-1	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
18	Готов к анализу	<input type="checkbox"/>	17-3107-2_E1	17-3107-2	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
19	Готов к анализу	<input type="checkbox"/>	21_D1	21	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
20	Готов к анализу	<input type="checkbox"/>	21-3107-2_F1	21-3107-2	Образец	Ген-эксперт Картофель	СД-450	Хорошее
21	Проанализирован	<input checked="" type="checkbox"/>	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 ось X значения, соответствующие их длине и количеству коротких tandemных повторов (рисунок 4).
- 4) Если пики фрагментов аллельной лестницы не совпадают их длине и количеству коротких tandemных повторов, то необходимо произвести редактирование бинов.

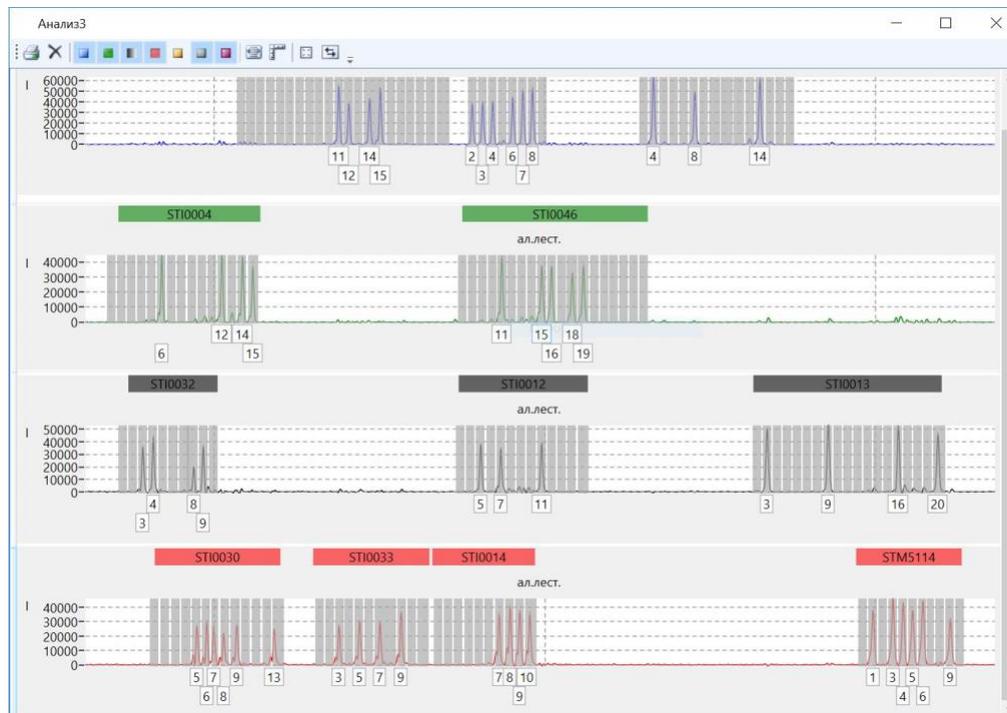


Рисунок 4. Электрофореграмма разделения аллельной лестницы

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 остальных 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”.



Рисунок 5. Пример электрофореграммы Положительного контрольного образца с использованием программы «ГенЭксперт «Картофель»»

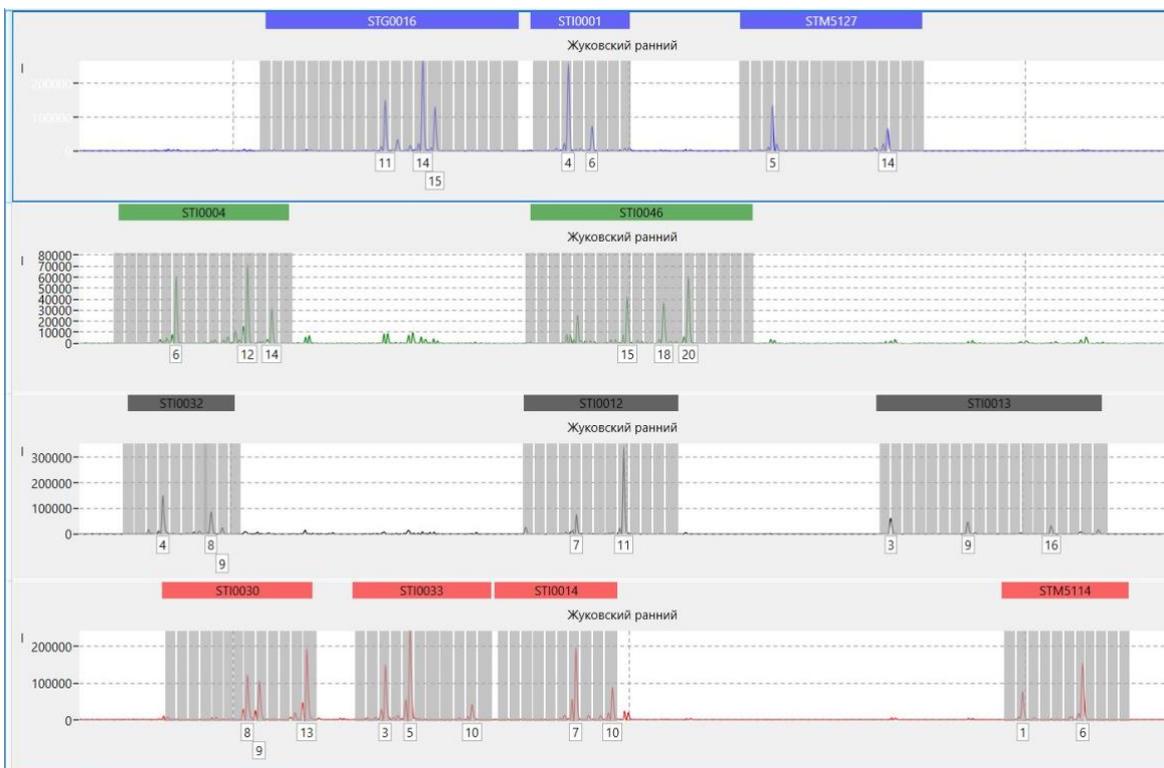
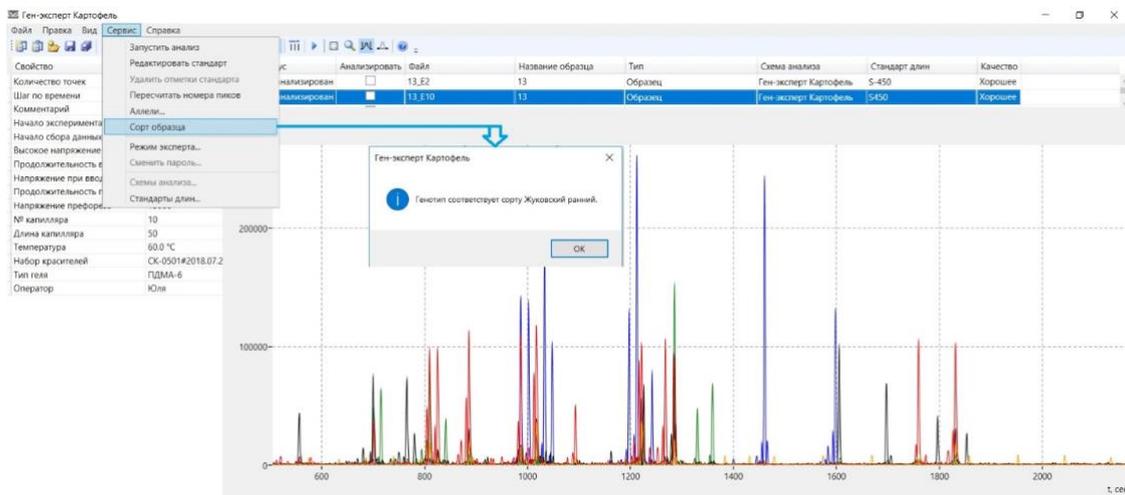


Рисунок 6. Результат анализа сорта Жуковский ранний, полученный с помощью набора «ГенЭксперт «Картофель»»

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 д 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.

7.6 Формирование протокола исследования

Протокол исследования формируется автоматически при нажатии кнопки Печать протокола.

Ген-эксперт Картофель

Общая хроматограмма

№	Статус	Анализировать	Файл	Название образца	Тип	Схема анализа	Стандарт длин	Качество
1	Проанализирован	✓	38_E5	38	Образец	Картофель v. 7.0	S-450	Хорошее

Панель аллелей по 12 локусам

Файл	Название образца	Панель	Качество
38_E5	38	Kartofel_ID_v10	Хорошее

Файл	Название образца	Панель	Качество
38_E5	38	Kartofel_ID_v10	Хорошее

Файл	Название образца	Панель	Качество
38_E5	38	Kartofel_ID_v10	Хорошее

Файл	Название образца	Панель	Качество
38_E5	38	Kartofel_ID_v10	Хорошее

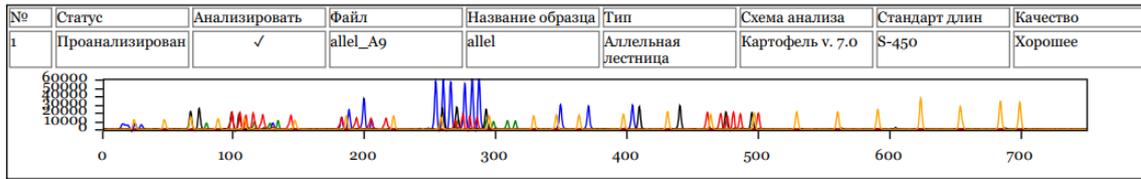
Генотип 12 локусов

№	Образец	STG0016	STI0001	STM5127	STI0004	STI0046	STI0032	STI0012	STI0013	STI0030	STI0033	STI0014	STM5114
		107-167	169-196	223-268	67-112	160-220	61-88	172-209	263-317	81-118	126-156	161-191	291-321
1	38	11-14-21	3-4-6-8	5-14	6-12-14	13-16-18-20	5-7-8-9	5-6-7-11	9-16	6-7-12	9-10	7-9-10	3-6
	Златка	11-14-21	3-4	5-14	6-12-14	13-16-18-20	5-7-8-9	5-11	9-16	6-7-12	9-10	7-9-10	3-6

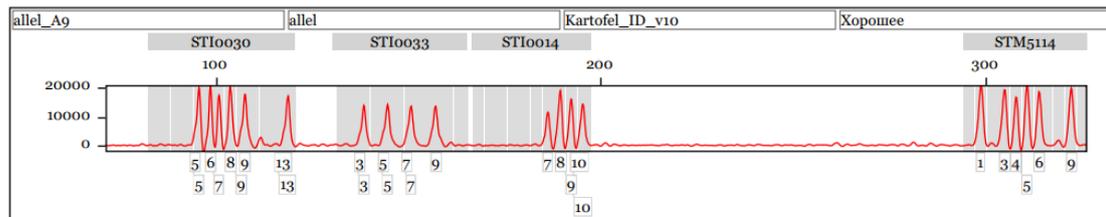
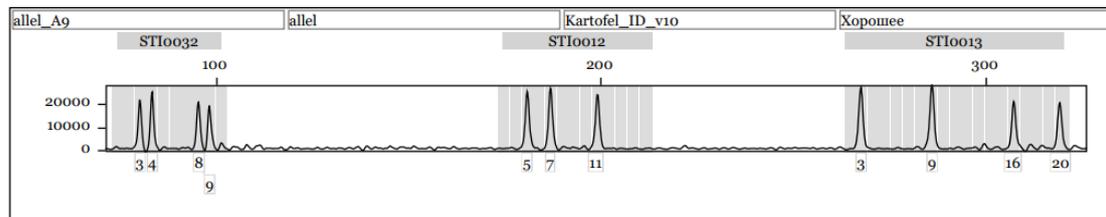
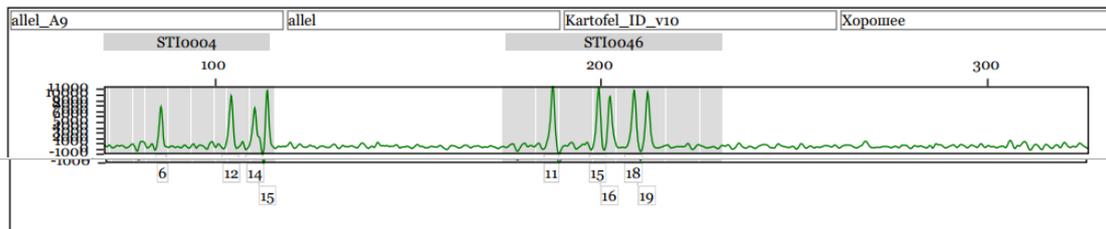
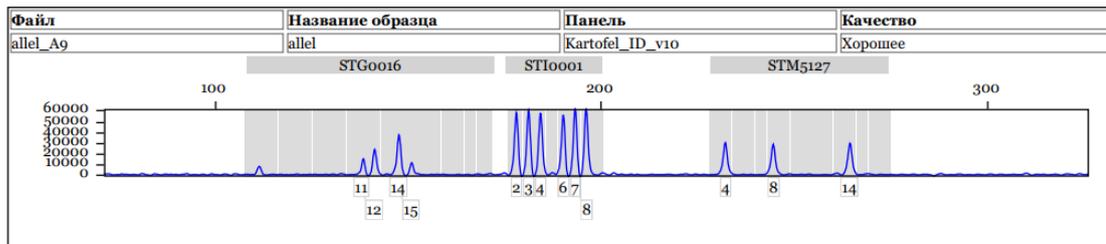
Заключение: Генотип соответствует сорту Златка

Ген-эксперт Картофель

Общая хроматограмма аллельной лестницы



Панель аллелей по 12 локусам



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

9. 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 Lübbeck, 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

