

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВИНОГРАДАРСТВА И ВИНОДЕЛИЯ ИМЕНИ Я.И. ПОТАПЕНКО»



УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ ВНИИВиВ,
канд. с.-х. наук
А. Н. Майстренко
"16" октября 2017 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА
ПО ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИИ СОРТОВ ВИНОГРАДА
«ДОНСКОЙ АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ИМ. Я.И. ПОТАПЕНКО»
МЕТОДОМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ»**

(Разработана в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Северо-Кавказский Федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»)

Идентификация генов ценных признаков в сортах винограда «Донской ампелографической коллекции им. Я.И. Потапенко» методом ДНК-маркерного анализа включает в себя две последовательные процедуры и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

- «Стандартная операционная процедура по выделению ДНК из растений винограда»
- «Стандартная операционная процедура по идентификации генов ценных признаков в сортах винограда методом ДНК-маркерного анализа»

ДНК-маркерный анализ генотипов сортов винограда «Донской ампелографической коллекции им. Я.И. Потапенко» осуществляется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ДНК-маркеров, тесно сцепленных с целевыми генами. Оценка результатов ПЦР проводится методом фрагментного анализа с использованием автоматического генетического анализатора ABI prism 3130.

Микросателлитный анализ проводят следующим образом:

2 Полимеразная цепная реакция

- 1.1 Подготавливают ПЦР-смесь (1,5 единицы Tag-полимеразы («СибЭнзим», Россия), 1xTag-полимеразного буфера («СибЭнзим»), 2мМ MgCl₂ («СибЭнзим»), 0,2 мМ каждого dNTP («СибЭнзим») и 200 мкМ каждого праймера («Синтол», Россия) общим объемом из расчета 25 мкл конечный реакционный объем для одной реакции (анализ одного образца);
- 2.2 Разливают ПЦР-смесь по 23,5 мкл в микропробирки объемом 0,2 мл и вносят в каждую отдельную пробирку образцы ДНК по 1,5 мкл (одна реакция – один образец ДНК);
- 2.3 Далее пробирки помещают в амплификатор. ПЦР осуществляют при следующих условиях: 5 минут – 95 °С; далее 35 циклов: 10 секунд – 95 °С, 30 секунд – T (оптимальная температура отжига праймеров конкретного ДНК-маркера), 30 секунд - 72 °С; последний цикл – 3 минуты при 72 °С.

3. Анализ продуктов ПЦР

- 2.1 После амплификации, продукты реакции разбавляют в 20-40 раз (в зависимости от концентрации ампликонов) и смешивают с буфером нанесения в пропорции 1:9 (1 мкл разбавленного ПЦР-продукта и 9 мкл буфера нанесения). Буфер нанесения состоит из 8 мкл Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) и 1 мкл меченного маркера веса S450 (ООО «Синтол»).
- 2.2 Отбирают в чистые пробирки объемом 0,2 мл по 10 мкл полученной смеси (буфер нанесения и разбавленный продукт реакции) и денатурируют 5 минут при 95 °С.

2.3 Пробирки помещают в плашку генетического анализатора. Электрофорез проводят при температуре 60 °С; 180 с - предварительный электрофорез, напряжение при заборе образца – 1,2 кВ, напряжение фореа – 15 кВ, продолжительность – 1500 - 1800 с в зависимости от размера целевого фрагмента.

2.4 Анализ и расчёт размера амплифицированных фрагментов проводят с использованием маркера молекулярного веса S450 и программного обеспечения GeneMapper v4.1 при стандартных настройках SSR-анализа. В работе используют праймеры – олигонуклеотиды, меченые флуоресцентными метками, которые при считывании в луче лазера прибора испускают свечение в различных волновых диапазонах: например, ROX – красный, TAMRA – желтый. Уточнение и при необходимости коррекция точных размеров ПЦР-фрагментов выполняется с использованием данных по ДНК контрольных (референсных) сортов – известных доноров гена.

Приборы и оборудование: Амплификатор (Eppendorf Mastercycler gradient), автоматический генетический анализатор ABI Prism 3130, наборы автоматических дозаторов, персональный компьютер, источники питания и др.

Расходные материалы: Пробирки объемом 0,2 мл в стрипах с прикрепленными и отдельными крышками, наконечники пластиковые для автоматических дозаторов и др.