

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



УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ ВНИИВиВ,
канд. с.-х. наук
А. Н. Майстренко

"16" октября 2017 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА
ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ ВИНОГРАДА
«ДОНСКОЙ АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ИМ. Я.И. ПОТАПЕНКО»**
(разработана в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»)

ДНК-паспортизация сортов винограда методом микросателлитного генотипирования в «Донской ампелографической коллекции им. Я.И. Потапенко» 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 генотипированию сортообразцов винограда»

Выделение образцов ДНК из сортов винограда проводят из молодых листочков апикальной части побегов типичных растений, соответствующих ампелографическому описанию сорта. Выделение ДНК может проводиться как со свежесобранного, так и с гербаризованного материала.

Экстракция ДНК осуществляется посредством следующих операций:

1. Образцы растительной ткани (фрагмент листовой пластинки общей площадью 1-1,5 см²) помещают в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл (одна пробирка – один сорт), к каждой пробе добавляют 2% ЦТАБ буфер (2% ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4М хлористого натрия, 0,1М Трис-гидрохлорида, 20мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат) объёмом 500 мкл.
2. Растительную ткань тщательно растирают в буфере, каждый раз очищая от растительных остатков и промывая в этиловом спирте пестик для растирания, чтобы избежать попадания материала из одной пробы в другую.
3. Далее пробирки с содержимым инкубируют 60-120 минут при 65⁰С.
4. Пробирки извлекают из термостата и вносят в каждую по 400 мкл хлороформа.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на шейкере в течении 15 минут.
6. Проводят центрифугирование в течении 10 минут при 5000 об/мин.
7. Аккуратно переносят надосадочную жидкость (супернатант) в новую пробирку объёмом 1,5 мл. Пробирка с осадком далее не нужна в работе.
8. К перенесённой жидкости добавляют 5х% ЦТАБ буфер (5% ЦТАБ и 350мМ ЭДТА): 0,2 объёма от объёма супернатанта.
9. Выдерживают образцы 10 минут при 65⁰С.
10. В каждую пробирку добавляют 200 мкл хлороформа и помещают в шейкер на 10 минут.
11. Проводят центрифугирование при 5000 об/мин в течении 10 минут.

12. Аккуратно отбирают верхнюю фазу в чистую пробирку; если раствор мутный или большая интерфаза после центрифугирования – повторяют пункты 10-12.
13. Добавляют 1,5 объема (от объема супернатанта) буфера для преципитации (1% ЦТАБ, 50мМ Трис-НСI, 10мМ ЭДТА) и оставляют на ночь при комнатной температуре.
14. На следующий день проводят центрифугирование при 8000 об/мин в течении 20 минут
15. Аккуратно сливают надосадочную жидкость.
16. Образовавшийся осадок растворяют в 500 мкл HS-TE буфера (1М NaCl, 10мМ Трис-НСI, 1мМ ЭДТА), иногда необходим нагрев для полного растворения (до 60 °С).
17. Добавляют 1 мл этилового спирта (96%) и выдерживают 2-3 часа при -20°С.
18. По истечении этого времени образцы центрифугируют 10 минут при 12500 об/мин, аккуратно сливают жидкость.
19. Образовавшийся осадок промывают 70% этиловым спиртом, затем высушивают, не допуская пересыхания.
20. Осадок растворяют в 50-100 мкл 0,1×TE буфера (в зависимости от количества осадка).
21. Хранят образцы ДНК в морозильной камере при -20 °С.

Приборы, оборудование и расходные материалы: твердотельный термостат, центрифуга, мультитортекс, автоматические дозаторы, источник питания, холодильник, вытяжной шкаф, морозильная камера, штативы для микропробирок, посуда из полимерных материалов (пробирки объемом 1,5 мл), пестики для гомогенизации в пробирках, 1,5/2,0 мл, наконечники пластиковые для автоматических дозаторов.