

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 2017г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА
ПО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ОБРАЗЦОВ ВИНОГРАДА
«ДОНСКОЙ АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ИМ. Я.И. ПОТАПЕНКО»
ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНИСТОЧНИКОВ МИЛДЬЮУСТОЙЧИВОСТИ**
(разработана в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»)

Идентификация генов милдьюустойчивости – сортов винограда «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 идентификации гена *Rpv10*»

Генотипирование образцов винограда «Донской ампелографической коллекции им. Я.И. Потапенко» для определения гена устойчивости к милдью *Rpv10* осуществляется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием тесно сцепленного ДНК-маркера GF 09-46 (Schwander и др., 2012). Согласно литературным данным, наличие резистентной аллели локуса *Rpv10* в генотипе винограда соответствует детекции ДНК-маркером GF 09-46 амплифицированного фрагмента размером 416 пар нуклеотидов. Оценка результатов ПЦР проводится методом фрагментного анализа с использованием автоматического генетического анализатора ABI prism 3130.

Микросателлитный анализ проводят следующим образом:

1 Полимеразная цепная реакция

1.1 Подготавливают ПЦР-смесь (1,5 единицы Tag-полимеразы, 1xTag-полимеразного буфера, 2мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dNTP и 200 мкМ каждого праймера общим объемом из расчета 25 мкл конечный реакционный объем для одной реакции (анализ одного образца);

1.2 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);

1.3 Далее пробирки помещают в амплификатор, амплификацию осуществляют при следующих условиях: 5 минут при 95°C, далее 35 циклов: 10 секунд при 95°C, 30 секунд при 60°C, 40 секунд при 72°C; последний цикл – 3 минуты при 72°C.

2. 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 при 95°C, 5 минут.

2.3 Пробирки помещают в плашку генетического анализатора. Электрофорез проводят при температуре 60°C; 180 с - предварительный форез, напряжение при заборе образца – 1,2 кВ, напряжение фореза – 15 кВ, продолжительность – 1540 с.

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. Один из праймеров, используемого ДНК-маркера должен быть мечен флуоресцентной меткой, которая при считывании в луче лазера прибора испускают свечение в определенном волновом диапазоне, например FAM – синий канал, R6G – зеленый, TAMRA – желтый.

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 прикреплёнными и отдельными крышками, наконечники пластиковые для автоматических дозаторов и др.