

Федеральное агентство научных организаций

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВИНОГРАДАРСТВА И
ВИНОДЕЛИЯ «МАГАРАЧ» РАН

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора ФГБУН
«ВНИИВиВ «Магарач» РАН
д. с.-х. наук, проф.

М.Н.Борисенко

11 » декабря 2017



ПРОТОКОЛ ВЕРИФИКАЦИИ

стандартной операционной процедуры

«Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)»

Янта 2017

Наименование образцов – образцы экстрагированной ДНК сортов винограда, поддерживаемых на ампелографической коллекции института «Магарач»

Цель заключается в верификации, полученных в соответствии с СОП «Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)», результатов выполнения ПЦР.

Исполнитель:

лаборатория сектора молекулярно-генетических исследований (МГИ) ФГБУН ВНИИВиВ «Магарач» РАН (ул. Кирова, 31, г. Ялта, РК).

Дата проведения верификации: ноябрь 2017 г.

Характеристика и обозначение образцов:

1 – 40 образцов ДНК экстрагированной из растительной ткани сортов винограда, для последующего ДНК - типирования сортов и диагностики фитоплазмы;

2 – 40 образцов ДНК, экстрагированной из бактериальной культуры сортов винограда, для последующей диагностики *Agrobacterium*;

2 – 40 образцов кДНК, синтезированной методом обратной транскрипции (ОТ) для последующей диагностики вирусных фитопатогенов.

Основные этапы верификации

- подготовка реакционной смеси, внесение специфических праймеров (PR):
 - * в целях последующего ДНК типирования сортов PR (F) вносится с флюорохромной меткой;
- подготовка и внесение в реакционную смесь экстрагированной ДНК или кДНК;
- внесение положительного контроля (K^+):
 - для последующего ДНК типирования сортов K^+ – это ДНК референтных сортов;
 - для диагностики фитопатогенов K^+ – это ДНК растения, пораженного патогеном;
 - K^- отрицательный контроль – это ПЦР смесь без ДНК
- процесс амплификации (ПЦР) ДНК или кДНК и получение ПЦР продукта для последующего ДНК типирования образцов сортов или тестирования вирусных и бактериальных фитопатогенов;

- nested ПЦР и получение ПЦР продукта для диагностики патогена (фитоплазма);
- визуализация продуктов ПЦР

Результаты верификации

Выполнена верификация результатов ПЦР 120 образцов ДНК 40 сортов винограда. Визуализация результатов ПЦР и nested ПЦР анализа выполнена методом гель-электрофореза в 1.3% агарозном геле с использованием ПЦР – продуктов, контрольных образцов и маркера длин ДНК фрагментов (DNA Ladder 100 bp., DNA Ladder 1kb). Присутствие на агарозном блоке ПЦР ампликонов, как в контрольных, так и в опытных образцах, в виде полос, светящихся под УФ и отсутствие их в негативном контроле – говорит о положительном результате выполненной ПЦР.

Заключение:

По результатам верификации показано, что порядок работ и методика, которые устанавливает СОП «Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)» является приемлемыми для получения качественных ПЦР- продуктов для последующего фрагментного анализа при выполнении ДНК-типовирования сортов и молекулярной диагностики вирусных, бактериальных и фитоплазменных болезней.

Зав. сектором МГИ, к.б.н.

Ведущий научный сотрудник, к.б.н., доцент

Младший научный сотрудник, к.с.-х.н.

 С.М. Гориславец

 В.И. Рисованная

 В.А. Володин