

ФГБНУ ВНИИСПК	
СОП №34 от 27.09. 2017г.	Стандартная операционная процедура ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ЛИСТЬЕВ ЯБЛОНИ
Цель СОП:	Упорядочить процесс выделения ДНК из листьев яблони
Разработчик:	Пикунова А.В.
Рабочее место:	Лаборатория биохимической генетики
Утверждено:	
Разработано на основании:	Diversity Arrays Technology P/L (DArT) (www.DiversityArrays.com) С изменениями

№	Описание операции	Время выполнения (для одновременного выделения 24 образцов)	Используемые материалы и приборы
1	Включить водяную баню на 65 С. Когда нагреется поместить в нее лизирующий буфер, производить все операции в чистых перчатках и лабораторном халате	0,5 мин	Пара нитриловых перчаток, лабораторный халат
2	Приготовить рабочий раствор, 25 мл (с запасом для 24 образцов): Взвесить 0, 6 г поливинилпироллидона (К 29-32) в пузырек с крышкой, Добавить 12, 5 мл экстракционного буфера с помощью мерного цилиндра, 12, 5 мл предварительно подогретого на водяной бане до полного растворения лизирующего буфера с помощью мерного цилиндра. Помешать взбалтыванием. Поместить рабочий раствор в водяную баню до полного растворения.	2 мин 2 мин 1 мин Ожидание - около 15 мин.	Пузырек с крышкой для рабочего раствора, Мерный цилиндр на 25 мл, весы лабораторные типа Scout Pro SPU202 (Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ USA), чистый шпатель, поливинилпирролидон (К 29-32), экстракционный буфер, лизирующий буфер.
3.	В 1,5 мл пробирки типа эппендорф с отобранным растительным материалом (свежим/высушенным/замороженным) добавить по 4-6 бусин для последующей гомогенизации в гомогенизаторе типа Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA)	15 мин	чистый шпатель с углублением, штатив для 1,5 пробирок
4.	*для высушенного материала гомогенизация в гомогенизаторе типа Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA) (включить прибор, открыть крышку прибора, выставить пробирки, плотнее закрыть крышки пробирок, закрыть крышку прибора, выбрать программу гомогенизации, запустить прибор), а затем добавить степпером по 750 мкл рабочего раствора.	5 мин 7 мин 7 мин	Гомогенизатор типа Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA) Степпер ленпипет, наконечник для степпера штатив для 1,5 пробирок

	<p>**для свежееотобранного или замороженного материала сначала добавление степпером по 750мкл рабочего раствора, а затем гомогенизация в гомогенизаторе типа Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA).</p> <p>При завершении цикла гомогенизации необходимо проверить степень гомогенизации – открыть крышку прибора и посмотреть каждую пробирку. При работе со свежим или замороженным материалом может понадобиться несколько циклов гомогенизации.</p>	<p>5 мин</p> <p>2мин</p> <p>+10</p>	
5.	<p>Пробирки с гомогенизированным материалом и рабочим раствором помещают из штатива в водяную баню или термостат в специальные подставки позволяющие беспрепятственный доступ воды/воздуха к стенкам пробирок с материалом (при температуре 65С).</p>	2 мин	<p>Водяная баня, штатив для 1,5 пробирок, Подставка для термостатирования 1,5 мл</p>
6.	<p>Во время термостатирования (в течение часа) необходимо дважды перемешать материал переворачиванием пробирок.</p>	12 мин x 2р= 24мин (термостатирование в течение часа)	
7.	<p>Переставить пробирки в штатив. Во включенном вытяжном шкафу добавить 700-750 мкл раствора Хлороформ:изоамилалкоголь (24 к 1) в каждую пробирку степпером</p>	30 сек	<p>Степпер ленпипет, наконечник для степпера</p> <p>штатив для 1,5 пробирок Хлороформ:изоамилалкоголь (24 к 1) Вытяжной шкаф</p>
8.	<p>Пробирки поместить в ротор для перемешивания в течение 15 мин, Задать программу, запустить прибор</p>	2 мин (перемешивание 15 мин).	<p>Ротор программируемый MultiBio Rs-24 (BioSan, Латвия) (операция может быть выполнена в ручную)</p>
	<p>Подготовить чистые пробирки, подписать их на крышке и сбоку перманентным маркером</p>	15 мин	<p>Пробирки 1,5мл чистые типа эппендорф, перманентный маркер с тонким стержнем</p>
9.	<p>Вынуть пробирки из ротора и поместить в центрифугу для центрифугирования. Задать программу (12 оборотов в минуту, 10 минут для одной центрифуги и 15 минут для второй - разница во</p>	4 мин	<p>две Центрифуги для 1,5 мл пробирок типа Центрифуга miniSpin (Eppendorf, Germany)</p>

	времени нужна, чтобы на следующем этапе отцентрифугированные образцы меньше ожидали своей очереди), запустить прибор.		
10.	Вынуть пробирки из центрифуги и поставить в штатив вдоль линии новых пробирок с соответствующими номерами. Отобрать в новые пробирки верхнюю фазу, не касаясь разделяющего фазы слоя и не захватывая нижнюю фазу, использовать наконечники и дозатор на 200 мкл, т.к. они позволяют более аккуратно отобрать фазу (общий объем фазы около 600 мкл). Для каждого образца менять наконечник.	20 мин	Штатив Дозатор одноканальный до 200 мкл. Наконечники до 200 мкл. Подписанные новые пробирки.
11.	Добавить в новые пробирки с отобранной верхней фазой эквивалентный объем изопропилового спирта (из холодильника).	7 мин	Степпер ленпипет, наконечник для степпера
12	Перемешать содержимое пробирок резким переворачиванием 10 раз.	5 мин	—
13	Поместить пробирки в центрифуги. Запустить приборы	3 мин (центрифугирование 10 мин)	две Центрифуги для 1,5 мл пробирок типа Центрифуга miniSpin (Eppendorf, Germany)
14	Слить изопропанол. Промокнуть верх пробирок и крышки о туалетную бумагу (каждый раз в новом месте) или бумажные полотенца. Следить за тем, чтобы осадок ДНК оставался на дне/стенке пробирки.	7 мин	Емкость для слива изопропанола.
15	Выставить пробирки в штатив, добавить 500 мкл 70 % этанола (из холодильника) степпером	7 мин	Степпер ленпипет, наконечник для степпера, 70 % этанола (из холодильника)
16	Несколько раз перевернуть каждую пробирку, обеспечивая соприкосновения этанола со всеми стенками и крышкой (чтобы лучше смыть остатки предыдущих растворов).	7 мин	
17	Поместить пробирки в центрифуги. Запустить приборы	3 мин (центрифугирование 10 мин)	две Центрифуги для 1,5 мл пробирок типа Центрифуга miniSpin (Eppendorf, Germany)
18	Слить этанол. Промокнуть верх пробирок и крышки о туалетную бумагу (каждый раз в новом месте) или бумажные полотенца. Следить за тем, чтобы осадок ДНК оставался на дне/стенке пробирки.	7 мин	Емкость для слива этанола.
19	Выставить пробирки в штатив, второй	7 мин	Степпер ленпипет,

	раз добавить 500 мкл 70 % этанола (из холодильника) степпером.		наконечник для степпера, 70 % этанола (из холодильника)
20	Несколько раз перевернуть каждую пробирку, обеспечивая соприкосновения этанола со всеми стенками и крышкой (чтобы лучше смыть остатки предыдущих растворов). Оставить на пол часа.	7 мин (на 30 мин оставить)	
21	Поместить пробирки в центрифуги. Запустить приборы	3 мин (центрифугирование 10 мин)	две Центрифуги для 1,5 мл пробирок типа Центрифуга miniSpin (Eppendorf, Germany)
22	Слить этанол. Промокнуть верх пробирок и крышки о туалетную бумагу (каждый раз в новом месте) или бумажные полотенца. Следить за тем, чтобы осадок ДНК оставался на дне/стенке пробирки.	7 мин	Емкость для слива этанола.
23	Поместить пробирки в центрифуги. Запустить приборы на короткое центрифугирование в течение 10-15 сек.	3, 5 мин	две Центрифуги для 1,5 мл пробирок типа Центрифуга miniSpin (Eppendorf, Germany)
24	Отобрать оставшийся этанол не задевая осадка ДНК, использовать наконечники и дозатор на 200 мкл, наконечники менять на каждый образец.	20 мин	Штатив Дозатор одноканальный до 200 мкл. Наконечники до 200 мкл.
25	Открытые пробирки с осадком ДНК поставить в твердотельный термостат на просушку (при температуре 36 С, программу задать на 30 мин). Пробирки выставит в несколько рядов в соответствии с размером осадка.	3 мин	твердотельный термостат типа Термо-48 (Biokom, РФ)
26	Через 10-15 минут проверить – высох ли осадок. Он, как правило, становится прозрачным и перестает блестеть.	3 мин	
27	К высохшему осадку добавить 50-150 мкл 1 x TE (в зависимости от размера осадка)	7 мин	1 x TE Дозатор одноканальный до 200 мкл. Наконечники до 200 мкл.
28	Оставить закрытые пробирки на 10-15 мин для растворения осадка ДНК в буфере. Затем встряхнуть их на вортексе до полного растворения осадка ДНК.	7 мин	Вортекс типа
29	Пробирки с раствором ДНК поместить в центрифуги для быстрого центрифугирования в течение 10 сек.	3,5 мин	две Центрифуги для 1,5 мл пробирок типа Центрифуга miniSpin (Eppendorf, Germany)
30	Поместить пробирки с раствором ДНК в штатив и заморозить или использовать	2 мин	штатив

для проведения анализа.		
-------------------------	--	--

Суммарная длительность СОП для анализа 24 образца: 273мин

Квалификация сотрудника:

М.н.с. или ст.н.с.

Оборудование

Наименование	Типовая модель	Производитель	Каталожный номер (web-адрес)
Гомогенизатор	Precellys Evolution	Bertin Technologies, USA	http://helicon.ru/catalog/oborudovanie/obshchelaboratornoe-oborudovanie/gomogenizatory/gomogenizator-precellys-evolution/ (~PB EQ02520-300-RD000.0)
Водяная баня	UT-4312	ULAB, Россия	33727 http://www.optimum-lab.ru/product/banya-vodyanaya-ulab-ut-4312-glubokaya/
Центрифуга	miniSpin	Eppendorf, Germany	http://pipetman.ru/laboratornye-centrifugi/Eppendorf-centrifugi/Eppendorf-MiniSpin-F-45-12-11 (Кат № 5452000018)
Центрифуга	miniSpin plus	Eppendorf, Germany	http://pipetman.ru/laboratornye-centrifugi/Eppendorf-centrifugi/Eppendorf-MiniSpin-F-45-12-11 (Кат № 5452000018)
Центрифуга-вортекс	Тета-2	Биоком, РФ	http://www.8a.ru/print/1875.php
Термостат твердотельный	Термо-48	Биоком, РФ	http://medical-cabinet.ru/kategoriya-tovarov/laboratornoe-oborudovanie/termostat-termo-48-4615/
Весы лабораторные	Scout Pro SPU 202	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ USA	http://www.euro-test.ru/cgi-bin/catalog.cgi?level1=300&level2=200&level3=240&w_code=21785
Ротор программируемый MultiBio Rs-24 (BioSan, Латвия)	MultiBio Rs-24	BioSan, Латвия	http://biosan.lv/ru/products/katalog/rotery-sheykery-rotatory-vorteksy/multi-bio-rs-24 (кат.№ BS-010117-AAG)
Степпер (Ленпипет, РФ)		Ленпипет, Россия	http://pipetman.ru/mehanicheskiy-stepper/4540002 (Кат. № 4540002)
Одноканальный дозатор до 200 мкл	Колор	Ленпипет, Россия	http://pipetman.ru/meh-avtomat-pipetki-kupit-moskva/Lenpipet-Black-4642082 (Кат. № 4642082)
Вытяжной шкаф	Лаб 1500 ШВ-Н	ЗАО НПО "Техноком", РФ	http://www.tehno.com/product.phtml?uid=B00120045647C В

Расходные материалы и личные средства защиты

Наименован	Много-	производителе	Каталожный номер (web-адрес)
------------	--------	---------------	------------------------------

ие	/одноразовый	ль	
Шпатель	Многоразовый	любой	# 3219 https://www.dia-m.ru/plastic/shpateli/bochem-3219-shpatel-lozhka-analiticheskii/
Халат лабораторный	Многоразовый	любой	VAE-W http://technologicalsystems.ru/antistatic_clothes/robe_vae-w.php
Перчатки нитриловые	Одноразовые, могут использоваться в течение дня	любой	http://stomatolog-servis71.ru/perchatki-manual-sn209-m-nitrilovye-smotrovye.html
Пузырек с крышкой для рабочего раствора	многоразовый	любой	11001530 http://www.minimed.ru/catalog/2528/
Мерный цилиндр на 25 мл	многоразовый	любой	3023-25 https://www.dia-m.ru/plastic/tsilindry-mernye/pyrex-3023-25--cilindr-mernyj-25-ml-klass-a-c.d.-02-s-nosikom-i-stekl.-osnovaniem-dv.-shkala-td-1-sht/
штатив для 1,5 пробирок	многоразовый	любой	# RA-7215 https://www.dia-m.ru/plastic/shtativy-dlya-probirok-tipa-eppendorf/russia-ra-7215-shtativ-rabochee-mesto-dlya-probirok-15-ml/
наконечники для степпера	одноразовый	любой	# 9404200 https://www.dia-m.ru/lab/steppery/acs/11210/
Пробирки 1,5мл	одноразовый	любой	MCT-150-C http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1350&id=6946
перманентный маркер с тонким стержнем	многоразовый	любой	008057 http://www.ipointer.ru/product/145209.html
Наконечники до 200 мкл.	одноразовые	любой	HT-200-960 https://www.laboratorii.com/laboratoryj-plastik/bez-filtra/224/?sphrase_id=38704