

ФГБНУ ВНИИСПК	
СОП №35 от 27.09. 2017г.	Стандартная операционная процедура ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
Цель СОП:	Упорядочить процесс проведения ПЦР анализа микросателлитных локусов
Разработчик:	Пикунова А.В.
Рабочее место:	Лаборатория биохимической генетики
Утверждено:	
Разработано на основании:	Guilford, P. et al. Microsatellites in Malus X domestica (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theor. Appl. Genet. 94, 249–254 (1997)

№	Описание операции	Время выполнения на один образец	Используемые материалы и приборы
1	Достать концентрированное ДНК из морозилки, разморозить, перемешать встряхиванием на вортексе.	От 30 сек 15мин 30 сек	Пара нитриловых перчаток, лабораторный халат, вортекс, штатив для пробирок
2	Развести концентрированное ДНК в 10 раз водой MQ (или водой для инъекций): Подписать пробирку объемом 0,6 мл типа эппендорф по номеру разводимой ДНК. Внести 90 мкл воды с помощью одноканального дозатора до 100 мкл, затем внести туда же 10 мкл концентрированной ДНК, перемешать пипетированием. Встряхнуть на вортексе. Поместить в центрифугу для быстрого центрифугирования.	От 15 сек 15сек 15сек 15сек 15сек	пробирка объемом 0,6 мл типа эппендорф, перманентный маркер с тонким стержнем, вода MQ (или вода для инъекции), одноканальный дозатор до 100 мкл, наконечник до 100 мкл, штатив для пробирок, центрифуга-вортекс
3.	Подготовить реактивы для сборки ПЦР: достать из морозилки, разморозить, буфер для Taq полимеразы, DNTps, MgCl ₂ , праймеры. Встряхнуть их на вортексе, быстро отцентрифугировать.	15 сек 25 сек 20 сек	центрифуга-вортекс, штатив для пробирок
4	Разведение праймеров. Мы заказываем лиофилизированные праймеры. Праймеры развести путем добавления одноканальной пипеткой 100-100 мкл необходимого количества воды MQ (или воды для инъекций) в соответствии с паспортом, оставить при комнатной температуре на 10-15 минут, встряхнуть на вортексе до полного растворения, отцентрифугировать.	15 сек	одноканальная пипетка 100-1000мкл, наконечник, вода MQ (для инъекций), штатив для пробирок

		15сек 15сек	
5	<p>Концентрированные праймеры (меченный прямой и обратный праймеры) разводим в соответствии с методикой в 50 раз: в чистую пробирку объемом 0,5 мл добавляем 384 мкл воды MQ (или воды для инъекций) и по 8 мкл каждого праймера, используя одноканальные дозаторы 100-1000 мкл и до 10 мкл и чистые наконечники соответствующего объема. Пробирку необходимо подписать</p>	15сек 15сек 10сек	<p>одноканальная пипетка 100-1000 мкл, одноканальная пипетка до 10 мкл, наконечник 100-1000 мкл, 2 наконечника до 10 мкл, вода MQ (для инъекций), пробирка 0,5 мл, штатив для пробирок,</p>
6.	<p>В отдельную пробирку (объем пробирки зависит от количества образцов в анализе, из расчета 19 мкл на образец) собрать основную смесь (Master Mix) из компонентов (на один образец), используя для каждого компонента отдельный наконечник (только после MQ допускается использовать наконечник повторно): 10x буфер для Taq полимеразы – 2 мкл, MgCl₂ (конц. 50 mM) – 0,8 мкл, dNTPs (конц. 2,5mM каждого) - 0,8 мкл, Смесь праймеров 2 мкл, Taq полимеразы (5 ед/мкл) – 0,06мкл (полимераза вынимается из морозилки непосредственно в момент добавления и тут же убирается), MQ (вода для инъекций) – 13,34 ! приведены усредненные цифры, концентрация праймеров, MgCl₂ и других компонентов может несколько варьировать при амплификации конкретного микросателлитного локуса, условия подбираются опытным путем. Смесь перемешать на вортексе, центрифугировать быстрым центрифугированием</p>	3,5 мин	<p>Пробирка типа эппендорф, Одноканальные пипетки до 10 мкл, до 100 мкл, до 1000 мкл, наконечники к ним, Центрифуга вортекс</p>
7	<p>В пробирки объемом 0,2 мл вносится 1 мкл ДНК (при большом количестве образцов можно использовать стрипы</p>	20сек	<p>Пробирки объемом 0,2 мл (при большом количестве образцов можно использовать стрипы</p>

	пробирок или 96 луночные плашки) каждый раз новым наконечником. Затем во все лунки вносится 19 мкл смеси (можно использовать один наконечник не касаясь пробирок и ДНК). Помимо анализируемых образцов необходимо выделить 2 пробирки под минус контроль (вместо ДНК добавляем воду для инъекции) и плюс контроль (добавляем ДНК, которое проверенно работает и известен результат данного ПЦР анализа).		пробирок или 96 луночные плашки, соответственно крышки для стрипов и пленку для заклеивания плашек), одноканальные пипетки до 10 мкл, до 100 мкл, наконечники к ним, штатив для пробирок 0,2 мкл
8	Пробирки встряхнуть на вортексе, отцентрифугировать, При использовании плашек/стрипов центрифугирование проводится в большой центрифуге со специальным ротором в специальных подставках.	От 20 сек до 1,5 мин	Центрифуга-вортекс, настольная центрифуга, подставка под плашки/стрипы
9	Включить амплификатор, задать программу амплификации: 95С – 5 минут; 35 циклов: 95 С- 30 сек, специфическая температура отжига праймера (предварительно подобранная на основании математических расчетов и экспериментальной проверки) – 30 сек, 72 С – 30сек-1 мин; 72С – 7 мин. Последний этап программы – 10 С бесконечно. Использовать опцию нагрева крышки амплификатора. Помещать образцы в амплификатор при нагреве более 80С.	3 мин До 5 мин	амплификатор
10	По завершении программы вынуть образцы из амплификатора и поместить в холодильник (при необходимости длительного хранения в морозилку)	30 сек	Холодильник или морозильная камера, штатив для пробирок

Суммарная длительность СОП для анализа 1 образца: 33,5 мин

Как правило, проводится анализ сразу нескольких образцов (до 96 за раз), при этом, время затраченное на 1 образец в целом сокращается.

Квалификация сотрудника:

М.н.с. или ст.н.с.

Оборудование

Наименование	Типовая модель	Производитель	Каталожный номер (web-адрес)
Центрифуга	miniSpin	Eppendorf, Germany	http://pipetman.ru/laboratornye-centrifugi/Eppendorf-centrifugi/Eppendorf-MiniSpin-F-45-12-11

			(Кат № 5452000018)
Центрифуга-вортекс	Тета-2	Биокон, РФ	http://www.8a.ru/print/1875.php
Одноканальный дозатор до 10мкл	Discover у Comfort	HTL,	HTL-DV*** https://www.laboratorii.com/oborudovanie-dlja-laboratorij/odnokanalnye-peremennogo-obema/avtomaticheskie-odnokanalnye-dozatory-discovery-comfort-peremennogo-obema-ntl/
Одноканальный дозатор до 100 мкл	Блэк	Ленпипет, Россия	4642072, http://thermoscientific-lab.ru/black
Одноканальный дозатор до 1000 мкл	Блэк	Ленпипет, Россия	4642092, http://thermoscientific-lab.ru/black
Холодильник	DSK 251	БЕКО, Турция	71003623 https://www.eldorado.ru/cat/detail/71003623/
Морозильная камера	SFR 167 NF	INDESIT, Италия	71010840 https://www.eldorado.ru/cat/detail/71010840/?show=response
Амплификатор, или Амплификатор	2720 T200	Applied Biosystems, USA Bio Rad, USA	https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/pcr/thermal-cyclers-realtime-instruments/thermal-cyclers/2720-thermal-cycler.html аналог 1861096 http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/t100-thermal-cycler
Центрифуга с ротором R-2 под 96 луночные плашки	LMC-3000	BioSan, Латвия	http://tehmedtorg.ru/produksiya/biosan/lmc-3000

Расходные материалы и личные средства защиты

Наименование	Много- /одноразовый	производитель	Каталожный номер (web-адрес)
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
Штатив под пробирки 1,5 мл	Многоразовый	любой	# RA-7215 https://www.dia-m.ru/plastic/shtativy-dlya-probiroki-tipa-ependorf/russia-ra-7215-shtativ-rabochee-mesto-dlya-probirok-15-ml/
Штатив под пробирки 0,2- 0,5	Многоразовый	любой	# RA-10005 https://www.dia-m.ru/plastic/shtativy-dlya-probirok-

мл			tipa-ependorf/russia-ra-10005-shtativ-raboochee-mesto-dlya-probirok-05-ml/
Вода для инъекций	Одноразовые	любой	https://apteka.ru/catalog/voda-dlya-inektsiy-2ml-n10-amp-r-l-groteks-_5513980c904d6/
10x буфер для Taq полимеразы MgCl ₂ (конц. 50 mM) DNTps (конц. 2,5мМ каждого)	Одноразовые	любой	http://dialat.ru
Лиофилизированные праймеры	Одноразовые	любой	www.syntol
Bio Taq полимеразы или аналог	Одноразовые	любой	http://dialat.ru
Наконечники для дозаторов до 10 мкл	Одноразовые	любой	HT-10-960 https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/bez-filtra/203/?sphrase_id=38704
Наконечники для дозаторов до 200 мкл	Одноразовые	любой	HT-200-960 https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/bez-filtra/224/?sphrase_id=38704
Наконечники для дозаторов до 1000 мкл	Одноразовые	любой	HT-1000-576 https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/nakonechniki/215/
Пробирки 0,5- 0,6 мл	Одноразовые	любой	SSI-3320-00 https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/probirki-dlya-ptsr-obemom-0-5-ml/283/
Пробирки 1,5 мл	Одноразовые	любой	MCT-150-C http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1350&id=6946
Стрипы с крышками	Одноразовые	любой	PCR-0208-C http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1353&id=6981
Плашки 96 луночные для ПЦР	Одноразовые	любой	PCR-96-C http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1360&id=7055
Пленка клейкая для плашек 96 луночных	Одноразовые	любой	PCR-TS http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1360&id=7057
Перманентный маркер с тонким стержнем	Многоразовый	любой	008057 http://www.ipointer.ru/product/145209.html