

ФГБНУ ВНИИСПК	
СОП №36 от 27.09. 2017г.	Стандартная операционная процедура ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР АНАЛИЗА С ПАРОЙ ПРАЙМЕРОВ VfC (ПО AFUNIAN ET AL., 2004) ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНА Vf
Цель СОП:	Упорядочить процесс проведения ПЦР анализа с парой праймеров VfC (по Afunian et al., 2004) для детекции гена Vf
Разработчик:	Пикунова А.В.
Рабочее место:	Лаборатория биохимической генетики
Утверждено:	
Разработано на основании:	Afunian, M.R., Goodwin P.H., Hunter D.M. Linkage Vf4 in Malus domestica and Malus floribunda with Vf resistance to the apple scab pathogen Venturia inaequalis// Plant Pathology. 2004, - p.467.

№	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 инъекций), 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 VfC1F (5'GGTTTCCAAAGTCCAATTCC3') и VfC2R (5'CGTTAGCATTTTGAGTTGAC3') 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 разводим в соответствии с методикой в 50 раз каждого (меченного прямого и обратного праймеров): 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 100-1000мкл и до 10 мкл и чистые наконечники соответствующего объема.</p> <p>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):</p> <p>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 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 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 (</p>	20сек	<p>Пробирки объемом 0,2 мл (при большом количестве образцов можно использовать стрипы пробирок или 96 луночные плашки, соответственно крышки для стрипов и пленку для заклеивания плашек), одноканальные пипетки до</p>

	вместо ДНК добавляем воду для инъекции) и плюс контроль (добавляем ДНК, которое проверенно работает и известен результат данного ПЦР анализа).		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; 30 циклов: 95 С- 30 сек, 56С – 30 сек, 72 С – 30сек-1 мин; 72С – 7 мин. Последний этап программы – 10 С бесконечно. Использовать опцию нагрева крышки амплификатора. Поместить образцы в амплификатор.	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	Biokom, 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	Блэк	Ленпипет, Россия	4642092, http://thermoscientific-lab.ru/black

1000 мкл			
Холодильник	DSK 251	BEKO, 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-realttime-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-probirok-tipa-eppendorf/russia-ra-7215-shtativ-rabochee-mesto-dlya-probirok-15-ml/
Штатив под пробирки 0,2- 0,5 мл	Многоразовый	любой	# RA-10005 https://www.dia-m.ru/plastic/shtativy-dlya-probirok-tipa-eppendorf/russia-ra-10005-shtativ-rabochee-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	Одноразовый	любой	www.syntol
Bio Taq	Одноразовые	любой	http://dialat.ru

полимераза или аналог	й		
Наконечники для дозаторов до 10 мкл	Одноразовый	любой	HT-10-960 https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/bez-filtra/203/?sphrase_id=38704
Наконечники для дозаторов до 200 мкл	Одноразовый	любой	HT-200-960 https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/bez-filtra/224/?sphrase_id=38704
Наконечники для дозаторов до 1000 мкл	Одноразовый	любой	HT-1000-576 https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/nakonechniki/215/
Пробирки 0,5- 0,6 мл	Одноразовый	любой	SSI-3320-00 https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/probirki-dlya-ptsr-obemom-0-5-ml/283/
Пробирки 1,5 мл	Одноразовый	любой	MCT-150-C http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1350&id=6946
Стрипы с крышками	Одноразовый	любой	PCR-0208-C http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1353&id=6981
Плашки 96 луночные для ПЦР	Одноразовый	любой	PCR-96-C http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1360&id=7055
Пленка клейкая для плашек 96 луночных	Одноразовый	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