

Приложение 3

К статье О.С. Колобовой, О.П. Малюченко, Т.В. Шалаевой, Е.П. Шаниной, И.А. Шилова, Я.И. Алексеева, Н.С. Велишаевой «Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров»

Дополнительные материалы

Выделение ДНК

1. 200 мг растительного материала растирали в ступке с жидким азотом.
2. Добавляли 500 мкл экстракционного буфера (100 мМ Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 М NaCl; 20 мМ ЭДТА; 2 % СТАВ), переносили в пластиковые пробирки 1.5 мл и инкубировали при 65 °С в течение 45 мин, периодически перемешивая.
3. Вносили 5 мкл РНКазы А в концентрации 10 мг/мл, инкубировали 15 мин при 65 °С.
4. Добавляли 500 мкл фенол-хлороформа. Интенсивно перемешивали и центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 5 мин.
5. Верхнюю фазу переносили в чистые пробирки с 50 мкл 10 % СТАВ-буфера (10 % СТАВ; 0.7 М NaCl). Смесь перемешивали и инкубировали 10 мин при 60 °С.
6. Добавляли 500 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали и центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 5 мин.
7. Верхнюю фазу переносили в чистые пробирки с 30 мкл 5 М KCH₃COOH, добавляли 1 мл 96 % этилового спирта, перемешивали и инкубировали при минус 20 °С в течение 20 мин.
8. Центрифугировали при 13 000 об./мин 10 мин, осадок промывали в 200 мкл 75 % этилового спирта, подсушивали и растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера.

ПЦР

1. Готовили реакционную смесь для амплификации:
2.5 мкл 10× ПЦР-буфера, 0.8 мкл Taq ДНК-полимеразы 5 ед./мкл (ДНК-Технология, Россия), 8 мкл dNTP 2.5 мМ (Медиген, Россия), от 3 до 10 пмоль каждого праймера, в зависимости от уровня флуоресценции (Синтол, Россия), 1 мкл ДНК и H₂O до 25 мкл.
2. Амплификацию осуществляли в термоциклере (CFX-96 BioRad, США) по программе: 95 °С – 3 мин (94 °С – 10 с, 60 °С – 30 с), 27 циклов, 72 °С – 5 мин. Наличие продуктов амплификации подтверждали в 2 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Фрагментный анализ

1. Для проведения фрагментного анализа 1 мкл амплификата смешивали с 1 мкл маркера молекулярного веса S-450 (Синтол, Россия) и 9 мкл формамида Super DI (MCLab, США).
2. Денатурировали при 95 °С в течение 5 мин.
3. Капиллярный электрофорез проводили в генетическом анализаторе «Нанофор-05» (Синтол-ИАП, Россия) с использованием полимера ПДМА-6 (Синтол, Россия) на капиллярах стандартной длины по инструкции к прибору.

Анализ результатов

Длины продуктов амплификации локусов, количество и соотношение высот пиков рассчитывали с помощью программного обеспечения «ДНК Фрагментный анализ» (ФГБНУ ИАП РАН, Россия).