**Задача 1. Выделение геномной ДНК из образцов тканей растений для последующего проведения генотипирования с использованием молекулярных маркеров**

**Методические указания к практикуму**

**"Современные технологии в селекции растений"**

**Начальный уровень**

**Выделение геномной ДНК из растений. Основные моменты.**

Получение препаратов геномной ДНК необходимого качества и в достаточной концентрации для проведения генотипирования является важнейшим условием успешной реализации программ маркер-ассоциированной селекции. Необходимо отметить, что степень чистоты препарата и конкретная концентрация геномной ДНК в большей степени определяется типом маркеров и используемой системой генотипирования. В случае маркеров одного типа, например, RFLP (ПДРФ), необходимы большие количества высококачественной ДНК, другие маркеры могут давать хорошие результаты при работе с небольшими количествами ДНК даже невысокого качества, например, многие ПЦР маркеры, в частности, микросателлитные маркеры. Это обстоятельство необходимо учитывать при выборе метода выделения геномной ДНК из каждой конкретной растительной культуры, а также иметь в виду при подборе маркеров для генотипирования.

Для выделения геномной ДНК из растительных тканей может быть использован целый ряд подходов. Однако же, стандартный протокол выделения геномной ДНК в обязательном порядке включает в себя следующие этапы:

1) Гомогенизацию образца и клеточный лизис. Гомогенизация образца имеет большое значение для увеличения выхода геномной ДНК в связи с наличием у растений жесткой клеточной стенки. В ходе гомогенизации происходит механическое разрушение клеточной стенки. Тщательная предварительная гомогенизация значительно повышает эффективность последующего лизиса. Для механического разрушения растительных образцов могут быть использованы стандартные гомогенизаторы типа “ротор-статор”, стальные или стеклянные шарики (bead mills), а также растирание в ступке в присутствии жидкого азота. Последние два метода гомогенизации являются наиболее эффективными.

В результате последующего лизиса происходит разрушение клеточных стенок и внутриклеточных структур, а также инактивация нуклеаз клетки, в частности ДНКазы. Важным компонентом буфера для лизиса является детергент, разрушающий клеточные мембраны. Особенностью растительных клеток является высокое содержание полисахаридов, полифенолов и кислот, которые могут оказывать негативное влияние на выход геномной ДНК и ингибировать последующие ферментативные реакции. В связи с этим, в качестве детергента с составе лизис-буфера для растительных тканей чаще всего используется ионнный детергент CTAB (цетилтриметиламмоний бромид). Особенностью молекулы CTAB является наличие положительного заряда иона аммония, который позволяет молекуле детергента вступать в электростатические взаимодействия с молекулами полисахаридов и гликопротеинов и денатурировать их, таким образом удаляя из лизата. В качестве ионного детергента также может использоваться SDS (додецилсульфат натрия). Другим важным компонентом является хелатирующий агент ЕДТА (EDTA), необходимый для инактивации внутриклеточных эндонуклеаз, а также PVP (поливинилпирролидон), позволяющий удалить вещества фенольной (ароматической) природы.

2) Элиминация клеточной РНК с помощью фермента РНКазы А.

3) Непосредственно очистка нуклеиновой кислоты из клеточного лизата. Основные различия между имеющимися способами выделения геномной ДНК заключаются в основном именно в способах очистки геномной ДНК из лизата клеток. Очистка геномной ДНК может производиться с использованием органических веществ, таких как фенол и хлороформ, что позволяет добиться высокого качества очистки, но оставляет риск загрязнения препарата остатками фенола. Финальный препарат двухцепочечной ДНК получают путем ее осаждения спиртом в присутствии повышенной концентрации солей и последующего растворения в 1× TE буфере или деионизованной воде с соответствующим уровнем pH. Другим подходом к очистке ДНК является раздельная сорбция ДНК на силиконовых колонках или магнитных шариках в присутствие повышенной концентрации положительных ионов с последующей элюцией нуклеиновой кислоты буфером низкой ионной силы (например, 1× TE).

**Задание 1. Выделение ДНК с использованием набора DiamondDNA.**

Данный метод предусматривает проведение лизиса растительных образцов с использованием буфера на основе детергента CTAB. Дальнейшая очистка препарата геномной ДНК от белковых примесей проводится с использованием раствора на основе ацетата калия. Селективное осаждение ДНК осуществляется изопропиловым спиртом с последующей отмывкой 70% EtOH.

Пошаговый протокол

Протокол от фирмы-производителя представлен в раздаточном материале к практикуму.

**Задание 2. Выделение ДНК с использованием набора Синтол Фитосорб**

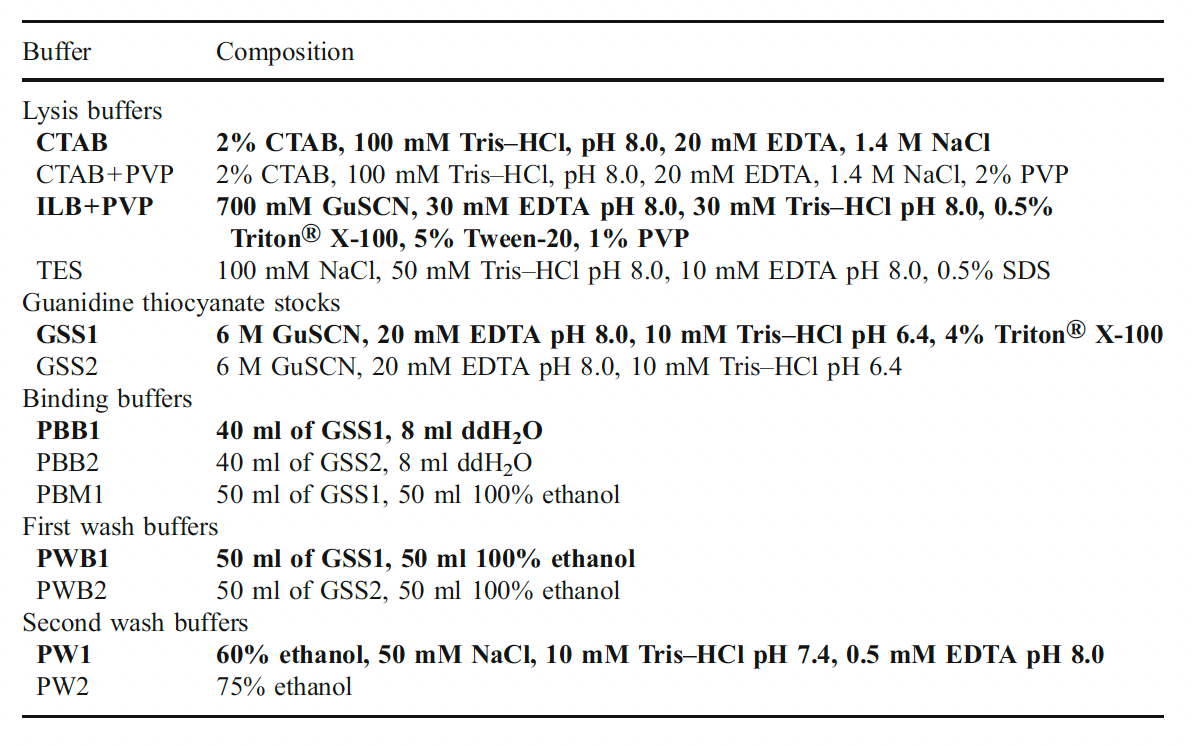
Данный метод также предусматривает проведение лизиса растительных образцов с использованием буфера на основе детергента CTAB. При этом очистка препарата геномной ДНК от белковых и прочих примесей проводится путем селективной сорбции геномной ДНК на покрытых силикагелем магнитных шариках с последующим осаждением преципитирующим реагентом.

Пошаговый протокол

Протокол от фирмы-производителя представлен в раздаточном материале к практикуму.

**Задание 3. Выделение ДНК с использованием колонок**

Данный метод также предусматривает проведение лизиса растительных образцов с использованием буфера на основе детергента CTAB. При этом очистка препарата геномной ДНК от белковых и прочих примесей проводится путем селективной сорбции геномной ДНК на силиконовых колонках.

**Список необходимых буферов и реактивов**

**Пошаговый протокол**

1. Поместите один 3 мм шарик (три 2 мм шарика) из карбида вольфрама (Qiagen) и ~5 мм2 (100 мг) свежих или высушенных образцов растительной ткани в пробирку. Работайте с каждой пробиркой по очереди, держа остальные пробирки закрытыми. Если вы работаете со свежим материалом, добавьте 200 мкл буфера для лизиса (Lysis buffer) перед гомогенизацией, если работаете с сухим или замороженным материалом, добавьте 200 мкл буфера для лизиса после гомогенизации.
2. Закройте пробирки и гомогенизируйте ткань, используя TissueLyser (Qiagen) при 30 Гц дважды в течение 30 с. Хорошо встряхните, центрифугируйте при 1 000X g в течение 1 мин и инкубируйте при 65°C в течение 1 ч на орбитальном шейкере.
3. Центрифугируйте при 13000 rpm в течение 5-10 мин и перенесите 50 мкл лизата в новую пробирку.

3. Добавьте 100 мкл буфера для связывания (Binding buffer) в каждую лунку.

4. Осторожно и медленно перемешайте три-четыре раза пипетированием, отсасывая и выливая обратно по 100 мкл. Перенесите 150 мкл лизата на колонку, предварительно помещенную в собирательную пробирку.

5. Для первого этапа промывки налейте на колонку 200 мкл буфера для первой промывки (First Wash Buffer). Центрифугируйте при 13000 rpm в течение 2 мин.

6. Для второго этапа отмывки добавьте 750 мкл второго буфера для отмывки (Second Wash Buffer) и центрифугируйте при 13000 rpm 2 мин.

6. Для второго этапа отмывки добавьте 750 мкл второго буфера для отмывки в каждую лунку GF-планшета, затем запечатайте его и центрифугируйте при 5 000Å~g в течение 5 мин.

7. Инкубируйте колонки при 56°C в течение 30 мин для испарения остатков этанола.

1. Чтобы элюироваьь ДНК, перенесите колонку в чистый 1.5 мл Эппендорф и добавьте 50 мкл ddH20 (при 56°C) на каждую колонку и инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 мин.

8. Центрифугируйте колонки при 13000 rpm в течение 2-5 мин для сбора элюата ДНК.

Xраните ДНК при 4°C для краткосрочного хранения или при -20°C для долгосрочного хранения.

**Качественная и количественная оценка препаратов геномной ДНК. Принцип метода.**

Оценка качества выделенной геномной ДНК проводится с помощью прибора NanoDrop 100. Метод оценки основан на измерении уровня поглощения исследуемого препарата при различных длинах волны: при 260 нм - поглощение молекул ДНК, при 280 нм - поглощение белковых молекул, и при 230 нм - органические соединения, полисахариды.

Препаратам ДНК, достаточной чистоты для генотипирования и секвенирования, присуща характерная спектрофотометрическая кривая (Рисунок).

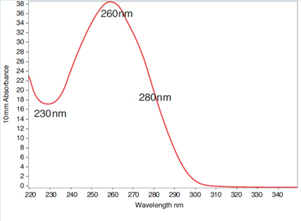


Рисунок. Спектрофотометрическая кривая чистого препарата ДНК

Характеристиками чистоты препаратов ДНК служат два соотношения: соотношение А260/А280, которое характеризует степень загрязненности препарата нуклеиновой кислоты белками, должно быть в пределах 1.6 - 1.8. Соотношение А260/А230, которое характеризует количество остаточных солей и веществ углеводной природы в препарате нуклеиновой кислоты, должно быть в пределах 1.8 – 2.2. Препараты, удовлетворяющие этим условиям, могут в дальнейшем использоваться для генотипирования с использованием маркеров.

Концентрация полученных препаратов ДНК будет измеряться с помощью флуориметра Qubit™ 3 (Invitrogen™). Определение концентрации нуклеиновых кислот основано на связывании селективного флуоресцентного красителя с молекулой ДНК. Количество молекул красителя, связавшего с нуклеиновой кислотой, пропорционально количеству нуклеиновой кислоты. В связанном состоянии краситель испускает флуоресценцию, которая измеряется прибором и далее уровень флуоресценции автоматически пересчитывается в содержание геномной ДНК.

Измерение концентрации с помощью флуориметрии является более точным, чем измерение концентрации непосредственно по поглощению нуклеиновых кислот в УФ при длине волны 260 нм, в частности, в связи с тем, что последний метод является высокочувствительным к содержанию в образце контаминантов, таких как соли, органические растворители, детергенты, белки и нуклеотиды. Необходимо отметить, что измерение флуоресценции является более чувствительным методом, что дает возможность более точно измерять содержание нуклеиновой кислоты в разбавленных образцах, то есть, образцах с заведомо низким содержанием нуклеиновых кислот.

Для визуализации геномной ДНК в полученных препаратах и оценки степени ее целостности будет использоваться метод электрофореза в агарозном геле.

Электрофорез ДНК в агарозном геле — это аналитический метод, позволяющий проводить разделение фрагментов ДНК по длине. Данный метод основан на разной скорости миграции фрагментов разной длины при движении в геле под действием внешнего электрического поля. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в ячеистой структуре геля, более короткие молекулы двигаются быстрее. Миграция фрагментов ДНК в геле под воздействие электрического поля проходит в направлении от катода (--) к аноду (**+**), что обусловливается отрицательным зарядом молекулы ДНК.

**Список необходимых реактивов и оборудования для проведения гель-электрофореза:**

Агароза LE

Электрофорезный буфер 10x TBE

Интеркалирующий краситель EtBr (готовый раствор 10 мг/мл в воде)

Маркеры длин фрагментов ДНК (DNA Ladder)

Краска для нанесения образцов на гель 4Х или 6Х (sample buffer)

Камера для горизонтального электрофореза

Гребенки пластиковые

Источник тока PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad)

Заливочный столик

Камера для заливки геля

Автоматические дозаторы переменного объема

Бытовая микроволновая печь

Система гель-документации FusionFix (Vilber Lourmat)

Фильтровальная бумага

Дистиллированная вода

Лабораторный пластик - наконечники для дозаторов

**Протокол**

1. Установите заливочный столик и выровняйте его по уровню.Это необходимо для того, чтобы толщина геля была одинаковой по всей его площади!
2. Соберите камеру для заливки геля и установите ее на заливочном столике.
3. Установите в камеру выбранную гребенку (гребенки различаются количеством формируемых лунок в геле и, соответственно, длиной и толщиной самой лунки). Между поверхностью камеры и концом гребенки должен оставаться зазор примерно в 1 мм.
4. Приготовьте необходимое количество 1x TBE буфера. Например, для приготовления 1 л 1x TBE из 10x TBE необходимо смешать 100 мл 10x TBE и 900 мл дистиллированной воды.
5. Взвесьте необходимое количество порошка агарозы. Добавьте нужный объем 1x электрофорезного буфера. Например, для анализа результатов микросателлитного анализа будет использоваться агарозный гель с содержанием агарозы 3% (масса/объем), а для анализа геномной ДНК - 1% гель. Для получения 100 мл геля такой процентности необходимо 3 г агарозы (или 1 г агарозы) и 100 мл буфера 1x TBE.
6. Расплавьте агарозу с буфером в микроволновой печи до получения тягучей прозрачной жидкости. Визуально оцените отсутствие частиц порошка агарозы или слипшихся «комочков». Остудите до температуры около 50°С.
7. Готовность раствора агарозы для заливки геля можно оценить, приложив емкость с расплавленной агарозой к руке. Если ощутимо горячо - заливать еще рано, если терпимо - то можно приступать к заливке геля.
8. Добавьте в агарозу краситель EtBr из расчета 5 мкл красителя на 100 мл агарозного геля (конечная концентрация EtBr в геле - 0.5 мкг/мл).
9. Залейте агарозу в камеру для заливки геля, стараясь не нарушить положение гребенки и не допуская формирования пузырей. После заливки убедитесь в отсутствии пузырей в геле, в случае их наличия, выгоните их пипеткой или побрызгайте поверхность геля 70% EtOH. Оставьте гель застывать на 30-40 мин.
10. После полного застывания геля выньте гребенку из геля. Поместите гель с подложкой в электрофорезную камеру. Залейте в камеру 1х TBE чуть выше уровня геля.
11. Подготовьте образцы выделенной ДНК для нанесения на гель. Образцы подготавливаются в отдельном планшете. Смешайте 4 мкл ПЦР реакции с 2 мкл 6х или 4x загрузочной краски (также можно использовать следующий подход - смешать 4.5 мкл ПЦР-реакции с 5.5 мкл воды для ПЦР и с 3.3 мкл 6x загрузочной краски). Тщательно перемешайте и при необходимости центрифугируйте, чтобы сбросить капли со стенок.
12. Внесите 6 мкл образца в лунку геля. Внесите в одну из лунок 5 мкл маркера длин фрагментов ДНК.
13. Закройте камеру крышкой, соблюдая полярность. Подключите электрофорезную камеру к источнику питания. Подайте на камеру напряжение 100 В и оставьте на 1 ч или более.
14. Когда нижний фронт красителя достигнет конца геля, выключите источник питания и отключите от него камеру.
15. Вытащите подложку с гелем из электрофорезной камеры. Выложите гель с подложки на трансиллюминатор системы гель-документации и включите УФ. Зафиксируйте результат с помощью встроенной фотокамеры.
16. Проанализируйте результаты.

**Задача 2. Использование микросателлитных маркеров (microsatellites – simple sequence repeats, SSR) для сортовой идентификации, определения сортовой чистоты и гибридности**

**Общие сведения о микросателлитах**

Микросателлиты – одни из первых высокополиморфных маркеров для генотипирования по индивидуальным локусам, основанные на использовании ПЦР.

**Характеристика микросателлитных маркеров.**

Микросателлиты или SSR (Simple Sequence Repeats), или STR (Simple Tandem Repeats), или STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site), – это особый класс ДНК-маркеров, которые представляют собой участок ДНК, расположенный в конкретном месте на конкретной хромосоме, содержащий большое количество идентичных нуклеотидных мотивов длиной в 2-8 пар нуклеотидов, тандемно повторенных до ста и более раз (например, CACACACACACACACA 50 CACACA). Микросателлиты распространены по всему эукариотическому геному. В зависимости от длины повтора микросателлиты классифицируют на локусы с ди-, три-, тетра-, пента-, и гексануклеотидными повторами. Формула данного локуса записывается как “название локуса” + (“нуклеотидная последовательность повторяющегося мотива”) + “количество повторов в наиболее часто встречающемся аллеле”, например, FCA149 (ТГ)17. Необходимо отметить, что SSR локусы могут содержать несколько типов повторов, тогда запись будет выглядеть таким образом, например, SSR5 (GGAA)8 G (GAAA)15.

Анализ индивидуальных микросателлитных локусов осуществляют с помощью ПЦР-амплификации, используя праймеры, комплементарные уникальным последовательностям (доменам), которыми фланкирован каждый микросателлитный локус. Различия, наблюдаемые между индивидуальными образцами, связаны с различиями в количестве повторов, которое приводит к различиям в длине продуктов амплификации (то есть длине фрагмента ДНК, фланкированного двумя праймерами), а не с различиями в последовательности ДНК как таковыми.

Микросателлиты имеют относительно малые размеры и длина амплифицированного участка вместе с праймерами в среднем не превышают 200-300 п. н., в связи с этим, даже сильно поврежденный биологический материал может содержать полные копии исследуемого фрагмента ДНК, обеспечивая их успешную амплификацию.

Микросателлитные маркеры обнаруживают высокую скорость мутирования, результатом чего является высокая полиморфность данного вида маркеров. Они часто могут содержать десятки аллелей в одном локусе, отличающихся один от другого по числу повторов. Данные маркеры имеют кодоминантный характер наследования, что позволяет дифференцировать анализируемые образцы как гомо- и гетерозиготы.

Данные свойства SSR маркеров позволяют использовать их для проведения генетической паспортизации, выявления сортовой принадлежности, определения сортовых примесей. Они широко используются для ДНК идентификации, для изучения генетического разнообразия. Микросателлитные маркеры выявляют генетическую дифференциацию в тех случаях, когда она не обнаруживается другими методами, например, среди близкородственных популяций или экологических групп одного вида.

Использование “генетических паспортов” на основе набора микросателлитных маркеров позволяет селекционеру уникально идентифицировать созданный ими сорт/гибрид, чтобы впоследствие иметь возможность, в том числе, защитить свои авторские права.

**Праймеры для микросателлитных маркеров.** Праймеры для микросателлитных маркеров обычно имеют стандартные характеристики. Для исследуемого микросателлитного локуса конструируют такую пару праймеров, чтобы комплементарные им участки ДНК, фланкирующие локус, были высокоспецифичны, то есть отсутствовали в других участках генома. Длина праймеров должна быть не менее 20-30 п. н., их 3′-концы не должны быть комплементарными друг другу.

**Особенности визуализации результатов.** Визуализацию результатов генотипирования с помощью микросателлитов можно проводить с использованием гель-электрофореза в агарозном геле. Для данного анализа рекомендуется использовать гели высокой плотности вплоть до 4-4,5%. Часто удобно для визуализации результатов анализа с использованием микросателлитов использовать полиакриламидные гели, которые обладают большей разрешающей способностью по сравнению с агарозным гелем. Использование полиакриламидного геля позволяет разделять фрагменты ДНК, различающиеся между собой по длине на столько мало, как несколько нуклеотидов.

Необходимо подчеркнуть, что в последние десятилетия были разработаны эффективные методы анализа микросателлитов с использованием праймеров, меченных флуоресцентными красителями, с последующей детекцией продуктов реакции с помощью капиллярного гель-электрофореза в автоматических секвенаторах ДНК – так называемый фрагментный анализ. Использование автоматизированных систем позволяет проводить одновременное генотипирование больших количеств образцов. Однако необходимо отметить, что использование SSR маркеров для значительных по размеру выборок образцов является все же технически затруднительным и связано с большими трудо- и время-затратами.

Среди недостатков микросателлитных маркеров можно указать, что высокая вариабельность маркеров данного типа в определенной степени ограничивает их применение в связи с тем, что данные, полученные с использованием разных платформ и для разных выборок, не всегда легко совместимы. Кроме того, количество SSR мотивов в геноме является конечным и их распределение по геному неравномерно, что не дает возможность одинакового насыщения всех геномных регионов SSR маркерами.

В связи с этим, в настоящее время для проведения сортовой идентификации и определения частоты сорта и происхождения находят применение однонуклеотидные полиморфизмы (SNP).

Для многих растительных культур имеются базы данных микросателлитных маркеров, которые могут использоваться для подбора и составления панелей микросателлитов для различных видов анализа, например,

<https://archive.gramene.org/markers/microsat/all-ssr.html> для риса,

<https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3/browse.cgi?class=marker> для злаковых (не только микросателлитные маркеры)

<http://www.brassica.info/resource/markers/ssr-exchange.php> для Крестоцветных.

<https://www.soybase.org/search/index.php?searchterm=BARCSOYSSR1.0&list=paper_listview> для сои

<https://www.maizegdb.org/data_center/ssr> для кукурузы. Для кукурузы доступны также коммерческие готовые наборы праймеров для проведения микросателлитного анализа, например, фирмы Sigma Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/plant-molecular-biology/maize-ssr-primer.html>

<http://webapp.cabgrid.res.in/sbmdb/> для свеклы (ссылка на статью, в которой дается информация о характеристиках данной базы данных Mir Asif Iquebal, Sarika Jaiswal, U.B. Angadi, Gaurav Sablok, Vasu Arora, Sunil Kumar, Anil Rai, Dinesh Kumar, SBMDb: first whole genome putative microsatellite DNA marker database of sugarbeet for bioenergy and industrial applications, Database, Volume 2015, 2015, bav111, <https://doi.org/10.1093/database/bav111>)

<http://www.peamarker.arriam.ru/> – база данных включает различные известные маркеры, в том числе, SSR-маркеры, описанные для гороха

<https://academic.oup.com/dnaresearch/article/21/1/53/347430> – для рапса. Ссылка на статью Jiaqin Shi, Shunmou Huang, Jiepeng Zhan, Jingyin Yu, Xinfa Wang, Wei Hua, Shengyi Liu, Guihua Liu, Hanzhong Wang. Genome-Wide Microsatellite Characterization and Marker Development in the Sequenced Brassica Crop Species. DNA Research, 21, 1, 2014, pp. 53-68.

**Практический кейс #1**

**Определение сортовой чистоты и сортовая идентификация у сои**

В рамках данного кейса необходимо:

1. Различить сорта и линии сои с использованием панели из 11 микросателлитных маркеров с применением двух различных подходов: ПЦР + гель-электрофорез и фрагментный анализ; а также определить однородность партий семян, принадлежащих одному сорту - практическое задание.
2. Определить принадлежность двух партий семян к одному сорту с использованием панели из 19 микросателлитных маркеров - теоретическое задание.

***Задание 1.***

***Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и визуализация результатов генотипирования с использованием микросателлитных маркеров (паттернов микросателлитов) с помощью гель-электрофореза в агарозном геле***

**В работе будут использоваться сорта сои Williams82 and Selecta, а также дополнительно две линии Oressa и Казачка**

Для решения поставленной задачи будет использован набор из 11 микросателлитов, которые имеют достаточно высокий уровень полиморфизма и позволяют однозначно идентифицировать исследуемые сорта сои.

Основной метод решения поставленных задач – ПЦР (полимеразная цепная реакция)

**Список необходимых реактивов и оборудования для проведения ПЦР:**

1. BioTaq/SmartTaq ДНК-полимераза (Диалат)
2. Буфер 10 х для проведения обычной ПЦР без хлорида магния (Диалат)
3. 50 мМ магния хлорид для ПЦР (Диалат)
4. 2,5 мМ dNTP mix для ПЦР (Диалат)
5. Вода для проведения ПЦР (Диалат)
6. Специфические праймеры
7. ДНК-амплификатор с блоком для ПЦР-планшетa, например, SimplyAmp Applied Biosystems
8. Дозаторы переменного объема
9. Емкость для льда
10. Vortex
11. Настольная центрифуга
12. Лабораторный пластик – наконечники для дозаторов, пробирки объемом 0,2 мл в стрипах или планшетах, пробирки объемом 1,5 мл, штативы

**Протокол**

1. Разморозьте компоненты для ПЦР смеси на льду. Разморозьте образцы ДНК для генотипирования.
2. На льду смешайте следующие компоненты реакции в указанном порядке. Объем реакции **25 мкл**. В скобочках указаны финальные и исходные количества и концентрации компонентов смеси, соответственно:

2,5 мкл 10 х PCR буфер для SmartTaq полимеразы

1 мкл 50 mM MgCl2

1 мкл (30 нг) ДНК (объем в мкл зависит от конц. препарата ДНК)

1 мкл (600 нМ) смесь 10 мкМ прямого и обратного праймера

2 мкл (300 мкМ) dNTP (2,5 мМ каждого)

17,25 мкл milli-QH2O (объем зависит от объема ДНК и праймеров)

0,25 мкл SmartTaq полимераза (5 U/мкл)

1. Тщательно перемешайте все компоненты смеси после добавления в ПЦР-пробирку пипетированием или коротким вортексированием. Держите ПЦР пробирки на льду до их помещения в амплификатор.
2. Включите амплификатор, поместите в него пробирки с реакционной смесью. Закройте крышку прибора. Установите программу амплификации.

Условия проведения амплификации:

I-й этап: 1 цикл: 94°С – 2 мин;

II-й этап: 10 циклов: 94°С – 30 с, 62°С – 30 с, 72°С – 1 мин;

III-й этап: 30 циклов: 94°С – 30 с, 55°С – 30 с, 72°С – 1 мин;

IV-й этап: 1 цикл: 72°С – 5 мин;

V-й этап: 1 цикл: 4°С – forever.

В данной задаче используется так называемый метод **Touchdown PCR (тачдаун ПЦР)**, который позволяет одновременно и **специфично!** проводить амплификацию с парами праймеров, которые имеют различия в температурах плавления (Tm – melting temperature).

1. После окончания реакции вытащите пробирки из амплификатора и отключите прибор.
2. Пробирки, содержащие продукты ПЦР рекомендуется хранить в холодильнике на - 20°С.

**Гель-электрофорез в агарозном геле. Основные моменты.**

Электрофорез ДНК в агарозном геле — это аналитический метод, позволяющий проводить разделение фрагментов ДНК по длине. Данный метод основан на разной скорости миграции фрагментов разной длины при движении в геле под действием внешнего электрического поля. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в ячеистой структуре геля, более короткие молекулы двигаются быстрее. Миграция фрагментов ДНК в геле под воздействием электрического поля проходит в направлении от катода (--) к аноду (**+**), что обусловливается отрицательным зарядом молекулы ДНК.

Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором, так называемым электродным буфером. Буферный раствор используется для создания непрерывного тока ионов между электродами, а также ионной силы и pH, необходимых для поддержания определенного заряда молекул ДНК. Для проведения электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в основном используются буферные растворы на основе борной, TBE (трис-борат-ЭДТА), или уксусной кислот, TAE (трис-ацетат-ЭДТА). Оба буфера являются взаимозаменяемыми для большинства видов аналитических разделений нуклеиновых кислот. Концентрации стоковых растворов TBE и TAE составляют 10 х или 50 х, рабочий буферный раствор является 1 х.

Для визуализации молекул ДНК в геле используются флюоресцентные красители, специфично взаимодействующие с ДНК, например, бромистый этидий, SYBR Green, SYBR Safe, Eva green, GelRed, или GelGreen, которые интеркалируют между азотистыми основаниями дуплекса ДНК и испускают флуоресценцию при воздействии УФ.

Для определения размеров анализируемых фрагментов ДНК производят сравнение положения исследуемых фрагментов ДНК в геле с набором коммерческих фрагментов ДНК известной длины (“DNA ladder”, “линейка”, “маркеры ДНК”). Помимо указания длины, в коммерческих маркерах также обычно приводится относительное и абсолютное содержание отдельных фрагментов в мкг, чтобы можно было, сопоставив интенсивность полос, примерно оценить количество (и концентрацию) ДНК в проверяемых образцах. При необходимости ДНК маркеры для гель-электрофореза можно изготовить самостоятельно, если обработать плазмиду с известным размером и известной рестрикционной картой или, что делается довольно часто, геномную ДНК фага лямбда – эндонуклеазой рестрикции. Для этого выбирается эндонуклеаза, при действии которой образуются в среднем 5-6 фрагментов различной длины.

В ходе электрофореза зоны миграции молекул нуклеиновых кислот остаются невидимыми глазу. В связи с этим при нанесении образца нуклеиновой кислоты на гель его смешивают со специальным буфером для нанесения (sample buffer), который содержит краситель/красители, молекулы которого также несут отрицательный заряд и способны продвигаться в геле в том же направлении, что и молекулы ДНК, но не взаимодействуют с ними. Фронт красителя продвигается в геле в виде окрашенной полосы и позволяет следить за ходом разделения. Обычно краситель, формирующий нижнюю границу миграции двигается в геле быстрее, чем самый короткий разделяемый фрагмент ДНК, в то время как краситель, формирующий верхнюю границу, примерно соответствует наиболее длинному фрагменту. Электрофорез прекращают, когда нижний фронт достигает необходимого положения в геле, чаще всего нижней границы геля. Буферы для нанесения коммерчески доступны и могут содержать один, два или три различных красителя с разной скоростью миграции (стандартные красители: Bromophenol Blue – нижний фронт и Xylene cyanol верх – ний фронт), их также можно приготовить самостоятельно.

Электрофорез в агарозном геле проводится в горизонтальной электрофоретической камере. Различные размеры камер позволяют проводить анализ от нескольких десятков (мини-гели) до нескольких сотен образцов.

Горизонтальный электрофорез в агарозном геле проводится при постоянном напряжении. Напряжение определяется для каждой индивидуальной камеры исходя из среднего расчета 4-6 В на 1 см расстояния между электродами (например, при расстоянии между электродами 20 см оптимальный диапазон напряжения составит 80-120 В). В целом, чем меньше подаваемое на электроды напряжение, тем медленнее происходит разделение фрагментов. Очень высокое напряжение, а следовательно очень высокая скорость миграции нуклеиновых кислот в геле, может приводить к искажению полос фрагментов ДНК в геле.

**Список необходимых реактивов и оборудования для проведения гель-электрофореза:**

1. Агароза LE
2. Электрофорезный буфер 10 x TBE
3. Интеркалирующий краситель EtBr (готовый раствор 10 мг/мл в воде)
4. Маркеры длин фрагментов ДНК (DNA Ladder)
5. Краска для нанесения образцов на гель 4 х или 6 х (sample buffer)
6. Камера для горизонтального электрофореза
7. Гребенки пластиковые
8. Источник тока PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad)
9. Заливочный столик
10. Камера для заливки геля
11. Автоматические дозаторы переменного объема
12. Бытовая микроволновая печь
13. Система гель-документации FusionFix (Vilber Lourmat)
14. Фильтровальная бумага
15. Дистиллированная вода
16. Лабораторный пластик - наконечники для дозаторов

**Протокол**

1. Установите заливочный столик и выровняйте его по уровню.

**Это необходимо для того, чтобы толщина геля была одинаковой по всей его площади!**

1. Соберите камеру для заливки геля и установите ее на заливочном столике.
2. Установите в камеру выбранную гребенку (гребенки различаются количеством формируемых лунок в геле и, соответственно, длиной и толщиной самой лунки). Между поверхностью камеры и концом гребенки должен оставаться зазор примерно в 1 мм.
3. Приготовьте необходимое количество 1 x TBE буфера.

Например, для приготовления **1 л** 1 x TBE из 10 x TBE необходимо смешать **100 мл** 10 x TBE и **900 мл** дистиллированной воды.

1. Взвесьте необходимое количество порошка агарозы. Добавьте нужный объем 1 x электрофорезного буфера.

Для анализа результатов микросателлитного анализа будет использоваться агарозный гель с содержанием агарозы **3**% (масса/объем). Для получения **100 мл** геля такой процентности необходимо **3 г** агарозы и **100 мл** буфера 1 x TBE.

1. Расплавьте агарозу с буфером в микроволновой печи до получения тягучей прозрачной жидкости. Визуально оцените отсутствие частиц порошка агарозы или слипшихся “комочков”.
2. Остудите до температуры около 50°С.

Готовность раствора агарозы для заливки геля можно оценить, приложив емкость с расплавленной агарозой к руке. Если ощутимо горячо – заливать еще рано, если терпимо – то можно приступать к заливке геля.

1. Добавьте в агарозу краситель EtBr из расчета **5 мкл** красителя на **100 мл** агарозного геля (конечная концентрация EtBr в геле – 0,5 мкг/мл).
2. Залейте агарозу в камеру для заливки геля, стараясь не нарушить положение гребенки и не допуская формирования пузырей. После заливки убедитесь в отсутствии пузырей в геле, в случае их наличия, выгоните их пипеткой или побрызгайте поверхность геля 70% EtOH.
3. Оставьте гель застывать на 30-40 мин.
4. После полного застывания геля выньте гребенку из геля.
5. Поместите гель с подложкой в электрофоретическую камеру. Залейте в камеру 1 х TBE чуть выше уровня геля.
6. Подготовьте образцы выделенной ДНК для нанесения на гель:
7. Образцы подготавливаются в отдельном планшете.
8. Смешайте **4 мкл** ПЦР-реакции с **2 мкл** 6 х или 4 x загрузочной краски (также можно использовать следующий подход – смешать 4,5 мкл ПЦР-реакции с 5,5 мкл воды для ПЦР и с 3,3 мкл 6 x загрузочной краски).
9. Тщательно перемешайте и при необходимости центрифугируйте полученные образцы, чтобы сбросить капли со стенок
10. Внесите **6 мкл** образца в лунку геля. Внесите в одну из лунок **5 мкл** маркера длин фрагментов ДНК.
11. Закройте камеру крышкой, соблюдая полярность. Подключите электрофоретическую камеру к источнику питания. Подайте на камеру напряжение 100 В и оставьте на 1 ч или более.
12. Когда нижний фронт красителя достигнет конца геля, выключите источник питания и отключите от него камеру.
13. Вытащите подложку с гелем из электрофоретической камеры. Выложите гель с подложки на трансиллюминатор системы гель-документации и включите УФ. Зафиксируйте результат с помощью встроенной фотокамеры.
14. Проанализируйте результаты.



**Задания:**

**а). Определите размеры полос ПЦР продуктов, полученных с использованием 11 микросателлитных маркеров, в геле для каждого исследуемого сорта и сравните их с теоретически ожидаемыми. Сравните между собой паттерны микросателлитов, полученные для четырех различных сортов. Сделайте выводы.**

**б). Сравните паттерны микросателлитов, детектируемые для одного и того же сорта (Williams82), полученного из двух источников. Сделайте выводы о принадлежности образцов к одному сорту.**

***Задание 2.***

***Визуализация результатов микросателлитного анализа (паттернов микросателлитов) с помощью “фрагментного анализа” на автоматическом генетическом анализаторе-секвенаторе***

Фрагментный анализ является одним из “вариантов” автоматического секвенирования. Он используется для регистрации микросателлитов, а также маркеров на основе SNP в случае, если различия между продуктами амплификации различных аллелей составляют несколько нуклеотидов и иногда даже CAPS маркеров (CAPS-фингерпринтинг).

В случае фрагментного анализа, для ПЦР используют пару праймеров, в которой один из праймеров содержит на 5’-конце флуоресцентный краситель. Для одного образца могут быть одновременно проведены ПЦР для генотипирования по разным маркерам, если соответствующие праймеры будут содержать флуоресцентные красители разных цветов. Далее проводится разделение флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК в секвенаторе методом капиллярного гель-электрофореза с детекцией сигнала флуоресценции, индуцированной лазером. Для определения длин амплифицированных фрагментов ДНК проводится их сравнение с длинами фрагментов ДНК с известными размерами (размерный стандарт). Анализ результатов с помощью специализированного программного обеспечения позволяет определить размеры фрагментов ДНК и идентифицировать генотипы на основании соотношения различных аллелей анализируемых маркеров.



**Задание:**

**Сравните визуализацию результатов микросателлитного анализа с использованием двух подходов – электрофореза в агарозном геле и фрагментного анализа.**

**Задача 3. Анализ генетического разнообразия коллекции или потомства от скрещивания двух родителей по конкретным генам/локусам**

Однонуклеотидный полиморфизм (ОНП, англ. Single Nucleotide Polymorphism, SNP, “снип”) — это позиции в геномной ДНК, имеющие размер в один нуклеотид для которых среди индивидуальных особей в популяции встречаются альтернативные варианты (аллели), причем частота наиболее редкого варианта (аллеля) составляет не менее 1%. По-другому, можно сказать, что ОНП – это отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом.

Чаще всего ОНП являются диаллельными, то есть существует два варианта состояния ОНП маркера. Это является следствием неодинаковой частоты разных типов нуклеотидных замен. ОНП маркеры также являются в большинстве своем кодоминантными (однако, свойство доминантности/кодоминантности для них в определенной степени зависит от используемой системы генотипирования).

Частота встречаемости ОНП в геномах растений и животных очень высока, что дает возможность использовать их для создания генетических карт высокой плотности для изучения генетического контроля устойчивости к различным заболеваниям, наследования разнообразных хозяйственно-ценных признаков и последующего создания маркеров на их основе для целей маркер-ассоциированой селекции. Кроме того, ОНП маркеры широко используются для оценки и сертификации сортов и линий. Для анализа ОНП в настоящее время разработано большое количество методических подходов, начиная от стандартного ПЦР-анализа до анализа с помощью чипов (SNP microarrays) и высокопроизводительного секвенирования. Широкий спектр возможных подходов позволяет разрабатывать системы генотипирования по ОНП маркерам, которые гибко адаптированы под конкретные цели и задачи каждого индивидуального исследования. Возможности автоматизации генотипирования на основе ОНП позволяет проводить одновременный анализ больших выборок образцов, делая процесс менее трудоемким и времязатратным.

В рамках практикума с использованием молекулярных маркеров будет оценено потомство от скрещивания сортов томата на предмет устойчивости к нескольким важным заболеваниям с использованием подхода классической ПЦР и ПЦР в реальном времени (real-time PCR).

**Практический кейс #2**

**Оценка генетического разнообразия – использование ко-доминантного маркера**

***Задание 1***

***Оценка потомства от скрещивания двух линий томата по устойчивости к корневой нематоде***

Корневая, галловая, нематода (*Meloidogyne* spp.) – один из наиболее широко распространенных паразитов томатов закрытого грунта. Ген *Mi – l,* интрогрессированный из *Lycopersicon petuvianum* L., является основным источником устойчивости к корневой нематоде (*Meloidogyne incognita. M. javanica*, и *M. Arenaria*) у культурного томата и наиболее широко используется при создании современных промышленных сортов.

С целью выявления аллеля устойчивости к мелойдогинозу применяется маркер к гену *Mi-1.2*.

Данный маркер формально не является SNP маркером, а относится к маркерам типа InDel. В этой связи его использование позволяет различать между собой гомозиготы и гетерозиготы, которые в данном случае будут проявляться как наличие двух продуктов ПЦР-амплификации, в отличие от одного продукта в случае обоих гомозигот, соответственно.

**Праймеры:**

Mi 23F: TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTTG

Mi 23R: GCATACTATATGGCTTGTTTACCC

**Состав реакционной смеси для ПЦР (15 мкл) в порядке добавления в пробирку:**

1,5 мкл 10 х PCR буфера для SmartTaq полимеразы

0,45 мкл 50 mM MgCl2

1 мкл (50 нг) ДНК (объем в мкл зависит от конц. препарата ДНК)

0,4 мкл (250 нМ) 10 мкМ прямого праймера

0,4 мкл (250 нМ) 10 мкМ обратного праймера

1,2 мкл (200 мкМ) dNTP (2,5 мМ каждого)

9,85 мкл milli-QH2O (объем зависит от объема ДНК и праймеров)

0,2 мкл SmartTaq полимеразы (5 U/мкл)

**Режим проведения амплификации:**

I-й этап: 1 цикл: 950С – 15 мин;

II-й этап: 35 циклов: 950С – 1 мин;

550С – 40 сек;

720С – 1 мин;

III-й этап: 1 цикл: 720С – 5 мин;

IV-й этап: 1 цикл: 160С – 2 мин.

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР можно проводить в агарозном геле при плотности **2%**. Гель следует помещать в электрофоретическую камеру с 0,5 х ТВЕ буфером таким образом, чтобы гель был погружен в буфер на 5 мм. В каждую дорожку геля нанести по 6 мкл продукта ПЦР, предварительно смешав с **2 мкл** 4 x буфера для нанесения на гель, для оценки размера использовать маркер длин фрагментов ДНК GeneRuler TM 100 bp (Thermo Scientific). Подготовку агарозного геля и образцов для нанесения необходимо проводить так, как указано выше для **Задачи 2**.

В результате амплификации с указанными праймерами могут быть выявлены следующие продукты: **фрагмент размером 430 п. н., свидетельствует о наличии аллеля восприимчивости, фрагмент размером 380 п. н., свидетельствует о наличии доминантного аллеля локуса Mi-1.2 и признака устойчивости к корневой нематоде.**



**Задание:**

**Проанализируйте результаты генотипирования 20 растений томата по изучаемому маркеру. Определите количество гомо- и гетерозиготных образцов.**

**Пракический кейс #3**

**Оценка генетического разнообразия – использование доминантного маркера**

В рамках решения данной задачи практикума будет использован метод аллель-специфичной ПЦР. Аллель-специфичная ПЦР – это такой вариант полимеразной цепной реакции, праймеры для которой подбираются таким образом, чтобы в результате амплифицировался только один из двух альтернативных аллелей. В случае другого аллеля амплификация происходить не будет из-за того, что праймер не будет способен отжигаться на матрице. В результате продукт амплификации будет отсутствовать. Таким образом, для растений, содержащих искомый аллель, например, аллель устойчивости к заболеванию, в результате ПЦР с соответствующими праймерами будет получен продукт амплификации определенного размера, который может быть визуализирован на геле. В случае растений, несущих аллель, связанный с отсутствием устойчивости, продукт амплификации на геле обнаруживаться не будет. Таким образом, оказывается возможным провести дифференциацию между двумя аллелями, определяя наличие/отсутствие продукта амплификации, например, методом гель-электрофореза. Необходимо отметить, что использованием данного маркера не позволяет различать между гомозиготами по доминантному аллелю – аллелю устойчивости и гетерозиготами, так как в данном случае оба генотипа будут одинаковым образом визуализироваться на геле. В связи с этим, данный тип маркера считается доминантным маркером.

Визуализация результатов генотипирования будет осуществляться с использованием двух вариантов – электрофоретического разделения продуктов амплификации с помощью классической ПЦР в агарозном геле и ПЦР в реальном времени (real-time PCR).

***Задание 1.***

***Оценка потомства от скрещивания двух линий томата по устойчивости к кладоспориозу***

В рамках решения данной задачи будет использован подход классической ПЦР.

Кладоспориоз – болезнь листьев томата, вызываемая патогенным грибом *Cladosporium fulvium.* С целью выявления аллелей устойчивости к кладоспориозу Cf9 и 9DC применяется доминантный маркер со следующими праймерами (прямой и два обратных):

CS5: tttccaacttacaatcccttc

CSl: gccgttcaagttgggtgtt (аллель Cf9)

DSl: gagagctcaacctttacgaa (аллель 9DC)

**Состав реакционной смеси для ПЦР (15 мкл) в порядке добавления в пробирку:**

1,5 мкл 10 х PCR буфера для SmartTaq полимеразы

0,45 мкл 50 mM MgCl2

1 мкл (50 нг) ДНК (объем в мкл зависит от конц. препарата ДНК)

0,4 мкл (250 нМ) 10 мкМ прямого праймера (CS5)

0,4 мкл (250 нМ) 10 мкМ обратного праймера (CS1)

1,2 мкл (200 мкМ) dNTP (2,5 мМ каждого)

9,85 мкл milli-QH2O (объем зависит от объема ДНК и праймеров)

0,2 мкл SmartTaq полимеразы (5 U/мкл)

**Режим проведения амплификации:**

I-й этап: 1 цикл: 950С – 15 мин;

II-й этап: 35 циклов: 950С – 10 сек;

550С – 30 сек;

720С – 40 сек;

III-й этап:1 цикл: 720С – 5 мин;

IV-й этап: 1 цикл: 40С – 2 мин.

В результате амплификации с указанными праймерами к локусам гена Cf9, обеспечивающим устойчивость к кладоспориозу (*Cladosporium fulvum*), могут быть выявлены следующие фрагменты: фрагмент размером **378 п. н. (аллель Cf9)** и **507 п. н. (аллель 9DC)**, свидетельствующие о наличии данных аллелей устойчивости.

В случае отсутствия данных аллелей устойчивости продукт амплификации образовываться не будет.

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводят в агарозном геле при плотности **1,5%**. Гель следует помещать в электрофоретическую камеру с 0,5 х ТВЕ буфером таким образом, чтобы он был погружен в буфер на 5 мм. В каждую дорожку геля нанести по 6 мкл продукта ПЦР, предварительно смешанного с **2 мкл** 4 x краски для нанесения, для оценки размера использовать маркер длин фрагментов ДНК GeneRuler TM 100 bp (Thermo Scientific).



**Задание:**

**Проанализируйте результаты генотипирования 10 растений томата по изучаемому маркеру. Определите количество гомо- и гетерозиготных образцов.**

***Задание 2.***

***Оценка потомства от скрещивания двух линий томата по устойчивости к кладоспориозу***

В данном случае для решения задачи будет использован метод ПЦР в реальном времени (real-time PCR, рвПЦР).

Основные отличия классической ПЦР и ПЦР в реальном времени

* В случае рвПЦР нет необходимости в проведении отдельной стадии детекции продуктов реакции – ампликонов, например, с помощью электрофореза; в данном случае, процесс появления продукта реакции можно наблюдать непосредственно; таким образом, сокращается время, необходимое для проведения генотипирования;
* Фиксирование результатов ПЦР проводится автоматически;
* В качестве одного из компонентов реакции служит интеркалирующий краситель, например, один из красителей семейства SYBR;
* Использование рвПЦР позволяет проводить точную количественную оценку количества исходной нуклеиновой кислоты, взятой в реакцию;
* Метод является более чувствительным;
* Использование данного подхода позволяет разрабатывать методы избирательной регистрации амплификации отдельных избранных фрагментов ДНК (в частности, при использовании олигонуклеотидных зондов);
* Низкий уровень контаминации продуктами ПЦР;

*В качестве дополнительного чтения по теме ПЦР и рвПЦР можно использовать книгу: ПЦР в реальном времени/Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др.; под ред. д.б.н. Д.В. Ребрикова; 2-е изд., испр. и доп. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 223 с.*

**Список необходимых реактивов и оборудования для проведения real-time ПЦР:**

1. 5 x реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген)
2. Вода для проведения ПЦР (Евроген)
3. Специфические праймеры
4. ДНК-Амплификатор в режиме реального времени с блоком для ПЦР-планшетa, например, QuantStudio (ThermoFisher - Applied Biosystems)
5. Дозаторы переменного объема
6. Емкость для льда
7. Vortex
8. Настольная центрифуга
9. Лабораторный пластик – наконечники для дозаторов, пробирки объемом 0,2 мл в стрипах или планшетах, пробирки объемом 1,5 мл, штативы

**Протокол**

1. Разморозьте компоненты для ПЦР смеси на льду. Разморозьте образцы ДНК для генотипирования.
2. На льду смешайте следующие компоненты реакции в указанном порядке. Объем реакции **25 мкл**. В скобочках указаны финальные и исходные количества и концентрации компонентов смеси, соответственно.

5 мкл 5 х реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR

0,5 мкл (5 нг) ДНК (объем в мкл зависит от конц. препарата ДНК)

0,5 мкл (200 нМ) 10 мкМ прямого праймера

0,5 мкл (200 нМ) 10 мкМ обратного праймера

18,5 мкл milli-QH2O (объем зависит от объема ДНК и праймеров)

1. Тщательно перемешайте все компоненты смеси после добавления в ПЦР-пробирку пипетированием или коротким вортексированием. Держите ПЦР пробирки на льду до их помещения в амплификатор.
2. Включите амплификатор, поместите в него пробирки с реакционной смесью. Закройте крышку прибора. Установите программу амплификации.

Условия проведения амплификации:

I-й этап: 1 цикл: 95°С – 5 мин;

II-й этап: 40 циклов: ramp – 1,6°С/c, 95°С – 10 с, 55°С – 30 с, (считывание флуоресценции), 72°С – 30 мин (считывание флуоресценции);

III-й этап: 1 цикл: построение кривой плавления (melting plot): ramp – 1.6°С/c, 95°С – 15 с, 60°С – 1 мин, ramp – 0.15°С/c: считывание флуоресценции, 95°С – 1 c

V-й этап: 1 цикл: ramp – 1.6°С/c, 4°С – forever.

1. После окончания реакции вытащите пробирки из амплификатора, проанализируйте результаты ПЦР.
2. Пробирки, содержащие продукты ПЦР рекомендуется хранить в холодильнике на - 20°С, в случае если планируется их дальнейшее использование или анализ.

Более технически сложные варианты визуализации результатов генотипирования c использованием молекулярных маркеров включают ПЦР в реальном времени (real-time PCR), HRM анализ – анализ кривых плавления продуктов ПЦР, содержащих разные полиморфные варианты, Amplifluor/KASPar технологию (использование праймеров специфическим образом меченных флуоресцентной меткой), секвенирование нового поколения (AmpliSeq или GBS) или гибридизацию на чипах (microarrays), находящих применение при массовом генотипировании по большому числу локусов одновременно и др.



**Задание:**

**Сравните результаты генотипирования 10 растений томата по изучаемому маркеру с использованием классической ПЦР + гель-электрофорез и ПЦР в реальном времени.**

**Практический кейс #4**

**Использование CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) маркеров для оценки генетического разнообразия растений томата по маркеру устойчивости к вирусу томатной мозаики TMV**

***Задание 1.***

***Определение аллельного состояния гена Tm2 в потомстве от скрещивания двух линий томата***

1. Проведение первого этапа генотипирования растений томата с целью определения аллельного состояния локуса TM2, определяющего устойчивость растений к вирусу мозаики томата, с использованием CAPS маркеров – этап ПЦР.

В работе будет использован маркер устойчивости Tm2RS-f3/Tm2RS-r3:

Tm2RS-f3: TGGAGGGGAATATTTGTGGA (прямой праймер 5’ - 3’)

Tm2RS-r3: ACTTCAGACAACCCATTCGG (обратный праймер 5’ - 3’)

**Протокол**

1. Разморозьте компоненты для ПЦР смеси на льду.

Разморозьте образцы ДНК для генотипирования.

1. Состав реакционной смеси (**15 мкл**) в порядке добавления в пробирку:

* 1,5 мкл 10 х PCR буфера для SmartTaq полимеразы
* 0,45 мкл 50 mM MgCl2
* X мкл (50 нг) ДНК (объем в мкл зависит от конц.препарата ДНК)
* 0,4 мкл (250 нМ) 10 мкМ прямого праймера
* 0,4 мкл (250 нМ) 10 мкМ обратного праймера
* 1,2 мкл (200 нМ) dNTP (2,5 мМ каждого)
* X мкл milli-Q H2O (объем зависит от объема ДНК и праймеров)
* 0,2 мкл SmartTaq полимеразы (5 U/мкл)

1. Тщательно перемешайте все компоненты смеси после добавления в ПЦР-пробирку пипетированием или коротким вортексированием. Держите ПЦР пробирки на льду до их помещения в амплификатор.
2. Включите амплификатор, поместите в него пробирки с реакционной смесью.

Установите программу амплификации.

Условия проведения амплификации:

I-й этап: 1 цикл: 95°С – 15 мин;

II-й этап: 35 циклов: 95°С – 1 мин; 61°С – 30 сек; 72°С – 1 мин;

III-й этап: 1 цикл: 72°С – 5 мин;

IV-й этап: 1 цикл: 16°С – 2 мин.

1. По окончании амплификации необходимо проверить качество ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для этого нужно приготовить гель с содержанием агарозы 1,5% и провести все последующие этапы согласно рекомендациям к Задаче 1.

Количество образца, наносимое на гель - **4 мкл**

**Размер амплифицированного участка составляет 703 п. н.**

1. После постановки электрофореза пробирки, содержащие продукты ПЦР рекомендуется убрать в холодильник на - 20°С до проведения следующего этапа - рестрикции.

2. Для дифференциации гомозиготных устойчивых, гомозиготных неустойчивых и гетерозиготных генотипов будет использоваться эндонуклеаза рестрикции *Hpa*I. Сайт узнавания GTT↑AAC. У образцов, несущих аллели устойчивости (Tm2 или Tm22), продукт амплификации разрезается эндонуклеазой *Hpa*I на два фрагмента: 458 и 245 п. н., у восприимчивых образцов рестрикция не происходит - на электрофореграмме обнаруживается один исходный фрагмент длиной 703 п. н.

Для проведения рестрикции будут использоваться продукты ПЦР реакции, полученные на предыдущем этапе.

**Список необходимых реактивов и оборудования для проведения рестрикции:**

1. Эндонуклеазы рестрикции и соответствующие им буферы - HpaI

2. Раствор BSA

3. milli-QH2O

4. Блочный термостат

5. Vortex

6. Настольная центрифуга

7. Дозаторы переменного объема

**Протокол**

1. Разморозьте буфер для проведения рестрикции и ПЦР реакцию. Тщательно перемешайте буфер после полного размораживания на Vortex.
2. В пробирке на 1,5 мл смешайте необходимые компоненты для проведения рестрикции. Рестриктазу внесите в пробирку в последнюю очередь.

!!!Важно!!! *Все работы со стоковым раствором рестриктаз необходимо проводить исключительно на льду. После того, как Вы достали фермент из холодильника сразу же поместите его в емкость со льдом, быстро отберите нужный объем и поместите фермент обратно в холодильник.*

Состав реакционной смеси для рестрикции (**20 мкл**):

* 5 мкл ПЦР смеси
* 2 мкл 10 x SE-Y буфера
* 1 мкл рестриктазы *Hpa*I (5 U/мкл) (СибЭнзим)
* 13 мкл milli-Q H2O

После добавления всех компонентов тщательно перемешайте смесь пипетированием или кратким вортексированием. При необходимости сбросьте капли со стенок кратким центрифугированием на Mini-spin или мини-центрифуге.

1. Поместите пробирку в блочный термостат на +37°С (оптимальная температура для работы *Hpa*I). Проведите реакцию в течение **2 ч**.

**Опционально**

После окончания реакции, эндонуклеазу рестрикции можно инактивировать путем инкубации при 65°С в течение 20 мин.

1. Визуализируйте результат рестрикции с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для этого нужно приготовить гель с содержанием агарозы 2% и провести все последующие этапы согласно рекомендациям к Задаче 1. Количество образца для анализа – **5 мкл.** Для оценки размера полученных фрагментов можно использовать маркер длин GeneRuler TM 100 bp (Thermo Scientific) или 50+ bp DNA Ladder (Евроген) в количестве **6 мкл**.



**Задание: Проанализируйте результаты генотипирования 10 растений томата.**