



Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования  
**«Крымский федеральный университет  
имени В.И. Вернадского»**

295007 Республика Крым, г. Симферополь,  
проспект Академика Вернадского, 4

**Отдел интеллектуальной собственности**

Начальник отдела:  
Бондаренко Даниил Владимирович  
Тел. раб. +7(3652)51 08 69  
Тел. моб. +7(978) 618 63 17  
[E-mail:work.daniil@mail.ru](mailto:work.daniil@mail.ru)

г. Симферополь, ул. Ялтинская, 20, каб. 308

**КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ В.И. ВЕРНАДСКОГО**



*Отдел интеллектуальной  
собственности*

**БИОТЕХНОЛОГИЯ  
№1**

2024 г.

## **Патент на изобретение № 2823067**

### **Авторы:**

**Крюков Лавр Андреевич,  
Водолажский Дмитрий Игоревич**

### **Способ оценки интенсивности фотосинтеза винограда с использованием показателя относительной копийности хлоропластной ДНК**

Изобретение относится к области биотехнологии и предназначено для оценки интенсивности фотосинтетических процессов с использованием оценки относительной копийности гена RPS16 хлоропластной ДНК винограда методом Real Time-PCR. Задачей способа оценки интенсивности фотосинтеза винограда с использованием показателя относительной копийности хлоропластной ДНК является оценка степени фотосинтетических процессов в листьях винограда с целью определения оптимальных условий его выращивания в лабораторных и естественных условиях.

Способ реализуется следующим образом.

Хлоропластная ДНК (хпДНК) существует в виде множественных копий на органеллу. хпДНК содержится в листьях, и изменяет свою морфологию и копийность в зависимости от функциональной нагрузки хлоропласта. [Kuroiwa T. Review of cytological studies on cellular and molecular mechanisms of uniparental (maternal or paternal) inheritance of plastid and mitochondrial genomes induced by active digestion of organelle nuclei (nucleoids). J Plant Res. 2010 Mar;123(2):207-30. doi: 10.1007/s10265-009-0306-9] Количество копий ДНК в хлоропластах оказывает непосредственное влияние на уровень экспрессируемой ими РНК и, таким образом, этот показатель может быть использован как маркер интенсивности работ этих органелл у растений [Udy DB, Belcher S, Williams-Carrier R, Gualberto

JM, Barkan A. Effects of reduced chloroplast gene copy number on chloroplast gene expression in maize. Plant Physiol. 2012 Nov; 160(3): 1420-31. doi: 10.1104/pp.112.204198].

Количественная ПЦР (кПЦР) позволяет измерять уровни ДНК органелл по отношению к ядерному гено-мишени. Мы использовали этот подход для определения изменений числа копий ДНК органелл относительно ядерного генома в листьях проростков винограда в условиях in vitro.

### **Формула изобретения**

Способ оценки интенсивности фотосинтеза винограда с использованием показателя относительной копийности хлоропластной ДНК, включающий световое воздействие на образец анализируемой пробы, отличающийся тем, что свежие листья винограда использовались для экстракции суммарной ДНК, суммарную геномную ДНК из 5-10 мг растительной ткани каждого образца экстрагировали с использованием модифицированной процедуры экстракции ДНК, количественную ПЦР (кПЦР) проводили с использованием автоматического анализатора Light-Cycler 96 при начальной денатурации при 95°C в течение 5 мин - 1 цикл, затем 45 циклов денатурации при 95°C в течение 10 с, отжиг при 58°C в течение 25 сек и элонгация при 72°C в течение 25 сек, определяли уровни ДНК органелл по отношению к ядерному гено-мишени, количество полученной ДНК измеряли флуориметрическим методом и набором реагентов, реакцию количественной RT-PCR проводили в 20 мкл реакционной смеси, состоящей из 10 мкл LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix, 10 нг общей ДНК объемом 5 мкл, 3 мкл воды и по 1 мкл соответствующих праймеров, определяли относительную копийность гена хлоропластной ДНК RPS16 с использованием гена хромосомной ДНК GAPDH в качестве

референсного, для количественной оценки относительной копийности митохондриальной ДНК использовали алгоритмы 2-ΔCt и 2-ΔΔCt, анализ первичных данных проводили с помощью программного продукта амплификатора, рассчитывали относительную копийность митохондриального гена RPS16 по формуле 2-ΔCt отдельно для опытных и контрольных образцов,  $K = K_{exp} / K_{normal}$ ,

где  $K_{exp}$  - относительная копийность гена RPS16 по сравнению с референсным геном GAPDH в тканях винограда после экспериментального воздействия,  $K_{normal}$  - относительная копийность гена RPS16 по сравнению с референсным геном GAPDH в тканях винограда в отсутствие каких-либо экспериментальных воздействий, при значениях, отличающихся от контрольных показателей на 10% и более, приходят к выводу об угнетении ( $K_{exp} < K_{normal}$ ) или интенсификации ( $K_{exp} > K_{normal}$ ) окислительного фосфорилирования в тканях растения, оцениваемого по показателям относительной копийности митохондриальной ДНК, если  $K_{exp} = K_{normal}$  в пределах 10% погрешности, делается вывод о неизменности данного показателя.