



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**

2025 г.

Патент на изобретение № 2836821

Авторы:

**Водолажский Дмитрий Игоревич,
Крюков Лавр Андреевич**

Способ не прямой оценки интенсивности окислительного фосфорилирования в тканях винограда с использованием показателя относительной копийности митохондриальной ДНК

Изобретение относится к области «биотехнология» и предназначено для не прямой оценки интенсивности процессов окислительного фосфорилирования с использованием параметров относительной копийности гена NAD1 митохондриальной ДНК по отношению к ядерному референсному гену GAPDH винограда методом Real Time-PCR. Технической задачей способа является упрощение не прямой оценки интенсивности процессов окислительного фосфорилирования в листьях винограда с целью определения оптимальных условий его выращивания в лабораторных и естественных условиях. Для проведения количественной RT-PCR геномной ДНК используют образцы суммарной ДНК, полученной из листьев винограда. Реакцию количественной RT-PCR проводят в 20 мкл реакционной смеси, состоящей из 10 мкл LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (LifeScience, Roche, Penzberg, Germany), 10 нг общей ДНК (5 мкл), 3 мкл воды и по 1 мкл соответствующих праймеров (форвард и реверс, 0,33 мкМ).

ПЦР проводят с использованием автоматического анализатора Light-Cycler 96 (Roche Life Science) с использованием следующей программы: начальная денатурация 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 с и элонгация при 72°C в течение 25 с. Определение относительной копийности генов NAD1 (митохондриальная ДНК) проводят с использованием гена GAPDH (хромосомная ДНК) в качестве референсного. Для количественной оценки использовали алгоритмы 2-ΔCt и 2-ΔΔCt (Schmittgen, Livak, 2008).

Проводят анализ первичных данных с помощью программного продукта амплификатора в размерности Ct, рассчитывают относительную копийность митохондриального гена NAD1 по формуле 2-ΔCt отдельно для опытных (exр) и контрольных (normal) образцов. где Kexр - относительная копийность гена NAD1 по сравнению с референсным геном GAPDH в тканях винограда после экспериментального воздействия, Knormal - относительная копийность гена NAD1 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 (Kexр<Knormal) ИЛИ Интенсификации (Kexр>Knormal) окислительного фосфорилирования в тканях растения, оцениваемое по показателям относительной копийности митохондриальной ДНК. Если Kexр=Knormal в пределах 10% погрешности делается вывод о неизменности данного показателя.

Данный показатель с использованием относительной копийности митохондриальной ДНК позволяет провести сравнительную оценку интенсивности процессов окислительного фосфорилирования.

Формула изобретения

Способ не прямой оценки интенсивности окислительного фосфорилирования в тканях винограда с использованием показателя относительной копийности митохондриальной ДНК, включающий оценку обменных процессов в проростках растений, отличающийся тем, что дополнительно проращивали растения Vitis vinifera L. сорта 'Chardonnay', оценивали влияние температурной обработки проростков растений в условиях in vitro в режиме 45°C 120 мин на интенсивность процессов окислительного фосфорилирования в листьях винограда, по показателю относительной копийности митохондриальной ДНК, при этом экспланты винограда выращивали на базовой среде Мурасиге-Скуга с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,2 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК) и 2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), экспериментальные сосуды с питательной средой и эксплантами, разделяли на 2 группы: экспериментальную группу растений

подвергали тепловой обработке в режиме 45°C, 120 мин exр в суховоздушном термостате, после окончания тепловой обработки листья винограда экспериментальную группу и контрольную группу растений, не подвергавшихся тепловой обработке, объединяли и растения инкубировали при температуре 23±1°C при 16-часовом фотопериоде и освещении 40-ваттными флуоресцентными лампами холодного белого света с интенсивностью 105-115 мкмоль PPFD/m²/с в течение 30 дней, из каждой группы растений случайным образом отбирали образцы листовых пластин для последующей экстракции суммарной ДНК, с препаратами полученной суммарной ДНК проводили реакцию количественной RT-PCR в 20 мкл реакционной смеси, состоящей из 10 мкл LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix, 5 нг ДНК 5 мкл, 3 мкл воды и по 1 мкл соответствующих праймеров форвард и реверс, 0,33 мкМ, RT-PCR проводили с использованием автоматического анализатора 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 с и элонгация при 72°C в течение 25 с, получали первичные данные в формате Ct, определяли относительную копийность гена митохондриальной ДНК NAD1 с использованием гена хромосомной ДНК GAPDH в качестве референсного, рассчитывали относительную копийность митохондриального гена NAD1 по формуле 2-ΔCt отдельно для опытных exр и контрольных образцов,

Увеличенное изображение (открывается в отдельном окне), где Kexр - относительная копийность гена NAD1 по сравнению с референсным геном GAPDH в тканях винограда после экспериментального воздействия, Knormal - относительная копийность гена NAD1 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, делали вывод об угнетении Kexр<Knormal или интенсификации Kexр>Knormal окислительного фосфорилирования в тканях растения, оцениваемого по показателям относительной копийности митохондриальной ДНК, если Kexр=Knormal в пределах 10% погрешности, делали вывод о неизменности данного показателя.