ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ИЦиГ СО РАН)

|  |  |
| --- | --- |
| **УДК 576.3(047.031)**  **№ госрегистрации** АААА-А17-117110270085-9  **Инв. №** | **«УТВЕРЖДАЮ»**  **Директор ИЦиГ СО РАН,**  **академик РАН**  **\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Н.А. Колчанов**  **«01» декабря 2017 г.** |

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ

Программа фундаментальных научных исследований  
государственных академий наук на 2013–2020 годы

58. Молекулярная генетика, механизмы реализации генетической информации, биоинженерия

КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ В ЦЕЛЯХ ПОИСКА НОВЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ БИОТЕХНОЛОГИИ  
И БИОИНЖЕНЕРИИ. ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ГЕНЕТИКИ И МЕТАБОЛИЗМА

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0324-2017-0003

Протокол Ученого совета

№ 22 от 18.12.2017

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Руководитель  зам. директора ИЦиГ СО РАН, канд. биол. наук | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ подпись, дата | С.Е. Пельтек |

Новосибирск – 2017СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Руководитель проекта |  |  |
| Зам. директора ИЦиГ СО РАН, канд. биол. наук | подпись, дата | С.Е. Пельтек |
| Исполнители проекта |  |  |
| Ст. науч. сотр., канд. биол. наук | подпись, дата | А.В. Брянская |
| Ст. науч. сотр., канд. биол. наук | подпись, дата | Т.Н. Горячковская |
| Ст. лаборант | подпись, дата | Е.А. Демидов |
| Инженер | подпись, дата | И.А. Мещерякова |
| Мл. науч. сотр., канд. биол. наук | подпись, дата | А.С. Розанов |
| Ст. лаборант | подпись, дата | К.В. Старостин |
| Ст. лаборант | подпись, дата | Ю. Е. Уварова |
| Нормоконтролер |  | Т.Ф. Чалкова |

подпись, дата

1.1 Стандартная операционная процедура по пересеву культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: А.В. Брянская, к.б.н., с.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур по пересеву культур микроорганизмов

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Пересев культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» осуществляется следующим образом.

Пересев культур микроорганизмов состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

- «Стандартная операционная процедура по выделению культур»

- «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»

- «Стандартная операционная процедура по подготовке к криоконсервации культур»

- «Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур».

1 Пересев культур, находящихся на хранении при температуре 4–8 оС.

1.1 С поверхности скошенной агаризованной среды, находящейся на хранении при температуре 4–8 оС производится пересев на соответствующую питательную среду в чашки Петри.

1.2 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

1.3 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

1.4 Выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды.

1.5 Пробирки с выросшими по штриху колониями ставят на хранение при температуре 4–8 оС.

1.6 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

1.7 В некоторых случаях, если рост на агаризованной среде не наблюдается, производят посев с поверхности скошенной агаризованной среды, находившейся на хранении, в соответствующую жидкую среду.

1.8 После посева пробирку ставят в качалку при 200–250 об/мин и необходимой температуре культивирования на 1–7 суток.

1.9 При наличии роста в жидкой среде, которое регистрируется по помутнению среды, иногда сопровождаемому пигментацией, появлению пленки, осадка, выделению газов, производят пересев на поверхность агаризованной среды.

1.10 Для этого из жидкой среды отбирают аликвоту 50–100 мкл и наносят на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. Высев производят сплошным газоном с использованием шпателя Дригальского.

1.11 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

1.12 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

1.13 После появления колоний на поверхности агаризованной среды выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды.

1.14 Пробирки с выросшими по штриху колониями ставят на хранение при температуре 4–8 оС.

1.15 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

2 Пересев культур, находящихся на хранении при температуре –70 оС.

2.1 Пробирки, находившиеся на хранении, размораживают максимально быстро.

2.2 Из пробирки с растаявшей суспензией клеток в растворе криопротектора, отбирают аликвоту 50–100 мкл и производят посев на соответствующую питательную среду в чашки Петри.

2.3 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

2.4 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

2.5 Выросшие изолированные колонии при необходимости снова переносят в раствор криопротектора и ставят на хранение при температуре –70 оС либо используют для работы.

2.6 В некоторых случаях, если рост на агаризованной среде не наблюдается, производят посев с поверхности скошенной агаризованной среды, находившейся на хранении в соответствующую жидкую среду.

2.7 После посева пробирку ставят в качалку при 200–250 об/мин и необходимой температуре культивирования на 1–7 суток.

2.8 При наличии роста в жидкой среде, которое регистрируется по помутнению среды, иногда сопровождаемому пигментацией, появлению пленки, осадка, выделению газов, производят пересев на поверхность агаризованной среды.

2.9 Для этого отбирают аликвоту 50–100 мкл из жидкой среды и наносят на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. Высев производят сплошным газоном с использованием шпателя Дригальского.

2.10 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

2.11 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

2.12 После появления колоний на поверхности агаризованной среды выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды.

2.13 Пробирки с выросшими по штриху колониями ставят на хранение при температуре 4–8 оС.

2.14 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

Пересев культур осуществляется с использованием следующего оборудования:

– Ламинарные шкафы (Clean Air)

– автоклавы (Sanyo)

– термостаты (Binder)

– термостатируемые качалки (Biosan)

– низкотемпературные холодильники (New Brunswick Scientific)

– микроскопическая техника ЦКП микроскопии (микроскопы световые и люминесцентные производства фирмы Zeiss)

Комплекты общелабораторного оборудования:

– наборы микропипеток

– источники питания

– холодильники

– центрифуги

– вытяжные шкафы

– анаэростат АЭ-01 и др.

1.2 Стандартная операционная процедура по подготовке к криоконсервации культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: А.В. Брянская, к.б.н., с.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур  
по криоконсервации культур микроорганизмов

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Подготовка к криоконсервации культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» осуществляется следующим образом.

1 Предварительная проверка культур микроорганизмов перед подготовкой к криоконсервации осуществляют в соответствии с требованиями следующих Стандартных операционных процедур:

– «Стандартная операционная процедура по идентификации культур молекулярно-биологическими методами»

– «Стандартная операционная процедура по идентификации культур масс-спектрометрическим методом»

– «Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур»

– «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»

2 Подбор условий культивирования, обеспечивающих оптимальный рост и/или максимальное спорообразование культур микроорганизмов (состав питательной среды, температура, время и другие условия) производят, исходя из сведений об особенностях культивирования штаммов в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии».

3 Выращивание культур микроорганизмов осуществляют следующим образом.

3.1 Культуры бактерий выращивают на соответствующих агаризованных или жидких средах в оптимальных условиях до хорошо заметного роста или стационарной фазы.

3.2 Культуры архей выращивают на соответствующих агаризованных или жидких средах в оптимальных условиях до хорошо заметного роста или стационарной фазы.

4 Стерильные полипропиленовые пробирки, пригодные для криоконсервации, объемом 1,5–2,0 мл (не менее 5 для каждой культуры) маркируют с указанием номера культуры и даты криоконсервации (месяц, год).

5 Подготовка криопротекторов

5.1 В качестве криопротекторов для культур, выращенных на плотной среде, используют одну из следующих композиций: 10–15% глицерин, 12% сахароза, сахарозо-желатиновый агар (СЖА) (10% сахарозы, 1,5% желатина, 0,1% агар-агара в дистиллированной воде), 10% диметилсульфоксид (ДМСО).

5.2 В качестве криопротекторов для культур, выращенных в жидкой среде, используют те же композиции, но в концентрации вдвое большей.

5.3 Криопротекторные композиции стерилизуют при 1 атм, 20 мин.

6 Заполнение пробирок культурами микроорганизмов.

6.1 Для криоконсервации готовят не менее 5 образцов каждой культуры.

6.2 Все операции проводят с соблюдением стерильности.

6.3 Микробный материал с поверхности агаризованной среды переносят в раствор выбранного криопротектора. При необходимости используют мини центрифугу‐вортекс. Концентрация клеток в суспензии – не менее 108 кл/мл.

6.4 Клетки культур с жидкой среды осаждают центрифугированием (10000 g, 3 мин). Осадок клеток разводят криопротектором. Концентрация клеток в суспензии – не менее 108 кл/мл.

6.5 Суспензию микроорганизмов в криопротекторе разливают в пробирки для криоконсервации по 1,0 мл, закрывают крышками и немедленно помещают в низкотемпературный холодильник при –70 оС.

Процесс криоконсервации культур осуществляется с использованием следующего оборудования:

– ламинарные шкафы (Clean Air)

– автоклавы (Sanyo)

– термостаты (Binder)

– термостатируемые качалки (Biosan)

– низкотемпературные холодильники (New Brunswick Scientific)

– спектрофотометр ПЭ-5400 (Экрос)

– мини центрифуга‐вортекс Микроспин [FV-2400 (Biosan](https://biosan.lv/ru/products/katalog/centrifugi-mini-centrifugivorteksy/fv-2400))

Комплектов общелабораторного оборудования:

– наборы микропипеток

– источники питания

– холодильники

– центрифуги

– вытяжные шкафы и др.

1.3 Стандартная операционная процедура по лиофилизации культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: А.В. Брянская, к.б.н., с.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур по лиофилизации культур микроорганизмов

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Лиофилизация культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» осуществляется следующим образом.

Лиофилизация культур микроорганизмов состоит из ряда последовательных процедур, включающих подготовку материалов, культур и собственно процесса лиофилизации и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

– «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»

– «Стандартная операционная процедура по подготовке к криоконсервации культур»

– «Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур»

– «Стандартная операционная процедура по пересеву культур».

1 Подготовка ампул/пробирок для хранения лиофилизованных культур.

Химически чистые стеклянные пробирки маркируют (номер культуры и дата лиофилизации) и стерилизуют при 1 атм, 40 мин.

2 Подготовка защитной среды.

2.1 Используют сахарозо-желатиновый агар (желатин – 1г, сахароза – 10г, вода дистилированная – 100мл) или обезжиренное молоко.

2.2.1 Сахарозо-желатиновый агар разливают в стеклянные пробирки (12 мл) по 5 мл; стерилизуют при 1 атм, 20 мин.

2.2.2 Обезжиренное молоко в концентрации 10% разливают в стеклянные пробирки; 3 раза стерилизуют текучим паром и проверяют стерильность путем инкубации 3 суток при 37 оС.

2.3 Защитные среды хранят при 5 оС не более 1 месяца.

3 Подготовку культур микроорганизмов перед лиофилизацией осуществляют в соответствии со «Стандартной операционной процедурой по подготовке к криоконсервации культур» с использованием вместо криопротектора адекватной защитной среды для лиофилизации. В качестве адекватной защитной среды для лиофилизации, обеспечивающей гарантированное сохранение жизнеспособности культуры данного штамма, используют среду культивирования, обеспечивающую оптимальный рост штамма.

4 Заполнение ампул/пробирок.

4.1 В подготовленные пробирки заливают около 1,0 мл суспензии клеток микроорганизмов в защитной среде. Плотность микроорганизмов должна быть высокой: 109–1010 клеток в 1 мл. Процедуру проводят в стерильных аэробных условиях.

4.2 Один образец суспензии используют для определения жизнеспособности культуры перед лиофилизацией, для чего его помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальный рост культуры.

5 Лиофилизация микроорганизмов.

5.1 Перед началом лиофилизации производится заморозка образца. Это может быть выполнено в отдельном от лиофильной сушки холодильнике при температуре от –20 до –70 оС или на полке лиофильной сушки в режиме «предзаморозка».

5.2 Замороженные образцы помещают в предварительно охлажденную камеру лиофильной сушки и включают вакуум.

5.3 Режим работы с культурами микроорганизмов: эвтектическая температура –40 оС и ниже, температура предзамораживания –50 оС и ниже, вакуум – 0,404 мБар и ниже.

5.4 По окончании высушивания вакуумный насос выключают, систему заполняют воздухом, ампулы/пробирки герметично закрывают крышками и извлекают из камеры.

6 Контроль жизнеспособности культур.

6.1 Через 24 часа после лиофилизации в пробирку с помощью пипетки вносят 0,5–1,0 мл стерильной водопроводной воды, физраствора или иной адекватной для регидратации данной культуры жидкости.

6.2 Через 30 мин (после полной регидратации) суспензию слегка пипетируют пипеткой и помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальное развитие культуры. Высев производят сплошным газоном с использованием шпателя Дригальского.

6.3 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

6.4 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

6.5 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

7 Хранение.

7.1 Ампулы/пробирки с образцами сохраняют в темноте при 4–6 оС.

Лиофилизация культур осуществляется с использованием следующего оборудования:

– лиофильная сушка FreeZone®Triad™Freeze Dry System 7400040 (Labconco)

– ламинарные шкафы (Clean Air)

– автоклавы (Sanyo)

– термостаты (Binder)

– термостатируемые качалки (Biosan)

– низкотемпературные холодильники (New Brunswick Scientific)

– микроскопическая техника ЦКП микроскопии (микроскопы световые и люминесцентные производства фирмы Zeiss)

Комплекты общелабораторного оборудования:

– наборы микропипеток

– источники питания

– холодильники

– центрифуги

– вытяжные шкафы и др.

2.1 Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: А.В. Брянская, к.б.н., с.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур по контролю жизнеспособности культур микроорганизмов

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Контроль жизнеспособности культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» осуществляется следующим образом.

Контроль жизнеспособности культур состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

– «Стандартная операционная процедура по выделению культур»

– «Стандартная операционная процедура по пересеву культур»

– «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»

– «Стандартная операционная процедура по подготовке к криоконсервации культур»

– «Стандартная операционная процедура по лиофилизации культур».

1 Контроль жизнеспособности культур после хранения при 4–8 оС

1.1 С поверхности скошенной агаризованной среды, находящейся на хранении при температуре 4–8 оС производится пересев на соответствующую питательную среду в чашки Петри.

1.2 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

1.3 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

1.4 Выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды.

1.5 Пробирки с выросшими по штриху колониями ставят на хранение при температуре 4–8 оС.

1.6 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

1.7 В некоторых случаях, если рост на агаризованной среде не наблюдается, производят посев с поверхности скошенной агаризованной среды, находившейся на хранении, в соответствующую жидкую среду.

1.8 После посева пробирку ставят в качалку при 200–250 об/мин и необходимой температуре культивирования на 1–7 суток.

1.9 При наличии роста в жидкой среде, которое регистрируется по помутнению среды, иногда сопровождаемому пигментацией, появлению пленки, осадка, выделению газов, производят пересев на поверхность агаризованной среды.

1.10 Для этого из жидкой среды отбирают аликвоту 50–100 мкл и наносят на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. Высев производят сплошным газоном с использованием шпателя Дригальского.

1.11 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

1.12 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

1.13 После появления колоний на поверхности агаризованной среды выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды.

1.14 Пробирки с выросшими по штриху колониями ставят на хранение при температуре 4–8 оС.

1.15 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

2 Контроль жизнеспособности культур, находящихся на хранении при температуре –70 оС.

2.1 Пробирки, находившиеся на хранении, размораживают максимально быстро.

2.2 Из пробирки с растаявшей суспензией клеток в растворе криопротектора, отбирают аликвоту 50–100 мкл и производят посев на соответствующую питательную среду в чашки Петри.

2.3 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

2.4 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

2.5 Выросшие изолированные колонии при необходимости снова переносят в раствор криопротектора и ставят на хранение при температуре –70 оС либо используют для работы.

2.6 В некоторых случаях, если рост на агаризованной среде не наблюдается, производят посев с поверхности скошенной агаризованной среды, находившейся на хранении в соответствующую жидкую среду.

2.7 После посева пробирку ставят в качалку при 200–250 об/мин и необходимой температуре культивирования на 1–7 суток.

2.8 При наличии роста в жидкой среде, которое регистрируется по помутнению среды, иногда сопровождаемому пигментацией, появлению пленки, осадка, выделению газов, производят пересев на поверхность агаризованной среды.

2.9 Для этого отбирают аликвоту 50–100 мкл из жидкой среды и наносят на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. Высев производят сплошным газоном с использованием шпателя Дригальского.

2.10 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

2.11 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

2.12 После появления колоний на поверхности агаризованной среды выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды.

2.13 Пробирки с выросшими по штриху колониями ставят на хранение при температуре 4–8 оС.

2.14 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

3 Контроль жизнеспособности культур после лиофилизации

3.1 Через 24 часа после лиофилизации в пробирку с помощью пипетки вносят 0,2–0,3 мл стерильной водопроводной воды, физраствора или иной адекватной для регидратации данной культуры жидкости.

3.2 Через 30 мин (после полной регидратации) суспензию слегка пипетируют пипеткой и помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальное развитие культуры. Высев производят сплошным газоном с использованием шпателя Дригальского.

3.3 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

3.4 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

3.5 После появления колоний на поверхности агаризованной среды выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды.

3.6 Пробирки с выросшими по штриху колониями ставят на хранение при температуре 4–8 оС.

3.7 Одновременно проводят контроль чистоты культуры согласно соответствующей СОП.

Контроль жизнеспособности культур осуществляется с использованием следующего оборудования:

– ламинарные шкафы (Clean Air)

– автоклавы (Sanyo)

– термостаты (Binder)

– термостатируемые качалки (Biosan)

– низкотемпературные холодильники (New Brunswick Scientific)

– лиофильная сушка FreeZone®Triad™Freeze Dry System 7400040 (Labconco)

– микроскопическая техника ЦКП микроскопии (микроскопы световые и люминесцентные производства фирмы Zeiss)

Комплекты общелабораторного оборудования:

– наборы микропипеток

– источники питания

– холодильники

– центрифуги

– вытяжные шкафы

– анаэростат АЭ-01 и др.

2.2 Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: А.В. Брянская, к.б.н., с.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур по контролю чистоты культур микроорганизмов

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Контроль чистоты культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» осуществляется следующим образом.

1 Определение чистоты выделенной культуры осуществляется несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред.

1.1 При визуальном контроле просматривается рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды. Такой контроль осуществляется для культур, способных расти на поверхности плотных сред.

1.2 Чистоту культур проверяют высевом на питательные среды, благоприятные для их роста, в том числе на мясопептонный агар (сусло, мясопептонный бульон, картофельный агар и др.). Однородность выросших колоний свидетельствует о чистоте культуры. Если рост по штриху неоднороден, культура загрязнена.

1.3 Для контроля чистоты культур под микроскопом готовится препарат фиксированных окрашенных клеток и просматривается с иммерсионной системой. Такой контроль возможен только для культур, имеющих морфологически однородные клетки.

1.4 Готовится препарат живых клеток и просматривается с использованием фазово–контрастного устройства. Такой контроль возможен только для культур, имеющих морфологически однородные клетки.

Контроль чистоты культур осуществляется с использованием следующего оборудования:

– ламинарные шкафы (Clean Air)

– автоклавы (Sanyo)

– термостаты (Binder)

– термостатируемые качалки (Biosan)

– низкотемпературные холодильники (New Brunswick Scientific)

– микроскопическая техника ЦКП микроскопии (микроскопы световые и люминесцентные производства фирмы Zeiss)

Комплекты общелабораторного оборудования:

– наборы микропипеток

– источники питания

– холодильники

– центрифуги

– вытяжные шкафы

– анаэростат АЭ-01 и др.

2.3 Стандартная операционная процедура по идентификации культур масс-спектрометрическим методом в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: К.В. Старостин, ст.лаборант

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур по идентификации культур масс-спектрометрическим методом

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Идентификация культур масс-спектрометрическим методом в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» состоит из ряда последовательных процедур, включающих в себя отбор проб, пробоподготовку, получение масс-спектров, идентификацию с помощью Biotyper 3 и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

– «Стандартная операционная процедура по пересеву культур»

– «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»

– «Стандартная операционная процедура по выделению культур»

1. Отбор проб

С помощью микробиологической петли 5–10 мг микробной культуры переносится в пробирку с 300 мкл деионизированной воды и ресуспензируется с помощью шейкера Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия). В начале и в конце работы, а так же после отбора каждой пробы микробиологическая петля обжигается в пламени горелки. Вместе с отбором проб микробных культур для идентификации проводится отбор пробы культуры *E.coli* для проведения калибровки масс-спектрометра. Отбор и пробоподготовка культуры *E.coli* проводится идентично с пробами культур для идентификации.

1. Пробоподготовка
   1. Инактивация микробных проб

К полученной суспензии добавляется 900 мкл перегнанного этанола. Смесь тщательно перемешивается на шейкере Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия) и центрифугируется 2 мин при 15600 g на центрифуге Centrifuge 5415R (фирма Eppendorf, Германия). Супернатант удаляется с помощью водоструйного насоса, а осадок высушивается 3 мин с помощью вакуумного концентратора Concentrator plus (фирма eppendorf, Германия).

* 1. Разрушение стенок микробных клеток

Осадок микробной культуры ресуспендируется в 50 мкл 70% муравьиной кислоты.

* 1. Экстракция белковой фракции

К суспензии добавляется 50 мкл ацетонитрила, полученная смесь тщательно перемешивается и центрифугируется 2 мин при 15600 g на центрифуге Centrifuge 5415R (фирма Eppendorf, Германия). Супернатант переносится в новую пробирку с помощью микропипетки и может быть использован для масс-спектрометрического анализа или отправлен на хранение.

* 1. Хранение

Образцы хранятся при температуре –20 ⁰С до 7 суток.

1. Масс-спектрометрический анализ подготовленных образцов
   1. Нанесение образца

На масс-спектрометрическую мишень MTP 384 ground steel (фирма Bruker Daltonics, Германия) наносится 0,8 мкл подготовленной пробы микробной культуры, после высыхания на нее наслаивается 0,8 мкл матрицы (6 мг/мл α-циано-4-гидрокси-коричная кислота в системе ацетонитрил/вода/трифторуксусная кислота (50:47.5:2.5, v/v). После высыхания матрицы мишень загружается в масс-спектрометр Ultraflex III TOF/TOF (фирма Bruker Daltonics, Германия).

* 1. Получение спектров

3.2.1 Для снятия масс-спектров используется метод со следующими параметрами.

– режим: линейный позитивный

– частота лазера: 100 Гц

– диапазон масс (Mass range): 2 – 20 кДа

– напряжение на электроде Ion Source 1: 25 кВ

– напряжение на электроде Ion Source 2: 23,45 кВ

– напряжение на линзе (Lens): 6 кВ

– параметр Pulsed Ion Extraction: 0 нс

3.2.2 Получение масс-спектра производится накоплением 500 лазерных импульсов (пять выстрелов по 100 импульсов (Shots) по разным позициям ячейки мишени содержащей нанесенный образец).

3.2.3 Для проведения калибровки прибора снимается масс-спектр для белкового экстракта культуры *E.coli*. Калибровка проводится с использованием точных значений масс известных белков *Escherichia coli*: RL36 4365,3 Да, RS22 5096,8 Да, RL34 5381,4 Да, RL32 6315,0 Да, RL29 7274,5 Да, RS19 10300,1 Да.

1. Идентификация образцов в программе Biotyper 3 (фирма Bruker Daltonics, Германия)

Для загрузки масс-спектров в программе Biotyper 3 (фирма Bruker Daltonics, Германия) выбирается меню File/Ad spectra. Для идентификации неизвестного образца по его масс-спектру используется стандартный метод MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method, выбор метода осуществляется в меню Edit/Meethod/MSP Identification. Для запуска процедуры выбрать в списке загруженных файлов необходимые и нажать иконку Start Identification либо выбрать пункт меню Action/Identification/Start.

Идентификация культур масс-спектрометрическим методом осуществляется с использованием следующего оборудования:

А Оборудование для отбора проб

– Бокс бактериальной воздушной среды БАВп-«Ламинар-С» (фирма LAMSYSTEMS, Россия)

– горелка спиртовая

– микробиологическая петля

– микропипетка объемом 100–1000 мкл (фирма eppendorf, Германия)

Б Оборудование для пробоподготовки образцов микробных культур

– вакуумный концентратор Concentrator plus (фирма eppendorf, Германия)

– шейкер Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия)

– микропипетки емкостью 10–100 мкл, 100–1000 мкл (фирма eppendorf, Германия)

– центрифуга Centrifuge 5415R (фирма eppendorf, Германия)

– водоструйный насос

В Оборудование для получения масс-спектров

– МАЛДИ времяпролетный масс-спектрометр Ultraflex III TOF/TOF (фирма Bruker Daltonics, Германия)

– персональный компьютер, подключенный к масс-спектрометру и работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом FlexControl (фирма Bruker Daltonics, Германия).

– масс-спектрометрическая мишень MTP 384 ground steel (фирма Bruker Daltonics, Германия)

– пипетка емкостью 0,1–2,5 мкл (фирма eppendorf, Германия)

Г Оборудование для идентификации культур с помощью пакета Biotyper 3

– Персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом BioTyper 3 (фирма Bruker Daltonics, Германия).

3.1 Стандартная операционная процедура по идентификации культур молекулярно-биологическими методами в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: А.С. Розанов, к.б.н., м.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур по идентификации культур молекулярно-биологическими методами

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

– «Стандартная операционная процедура по пересеву культур»

– «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур».

– «Стандартная операционная процедура по выделению культур»

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами по последовательности гена 16S rRNA состоит из ряда последовательных процедур, включающих в себя отбор проб, пробоподготовку, выделение геномной ДНК, амплификацию гена 16S rRNA, визуализацию при помощи горизонтального гель-электрофореза, подготовку полученных ампликонов и получению информации о последовательности с использованием программы Sequence Scanner v1.0.

1. Отбор проб

С помощью микробиологической петли 5–10 мг микробной культуры переносится в пробирку на 1.5 мл. В начале и в конце работы, а так же после отбора каждой пробы микробиологическая петля обжигается в пламени горелки.

1. Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК проводится с использованием коммерческого набора для выделения ДНК «БиоСилика» или «diaGene для выделения геномной ДНК из бактериальных клеток», согласно инструкции производителя.

1. Амплификация гена 16S rRNA

Постановка ПЦР проводится в ПЦР-боксе DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-M-AR (BIOSAN). На одну реакцию берется 23 мкл воды, 3 мкл 10-кратного буфера, 1 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатов, по 1 мкл прямого и обратного праймера, 0,15 мкл термостабильной Taq SE-полимеразы. Готовый мастер-микс затем аликвотируется по индивидуальным тонкостенным пробиркам для ПЦР. Затем добавляется 1 мкл раствора, содержащего ДНК-матрицу. На вортексе Microspin FV-2400 (BIOSAN) смесь перемешивается и сбрасываются капли. Пробирки ставятся в амплификатор T100 Thermal Cycler (BioRad). Выставляется температура первичной денатурации 95 °С на 3 мин, затем основная программа, состоящая из 33 циклов: 95 °С – 30 с, 54 °С – 30 с, 70 °С – 2 мин. После последнего цикла, образцы выдерживаются при 70 °C в течение 5 мин для заполнения выступающих 5 штрих концов ПЦР продуктов комплементарной цепью.

1. Электрофоретический анализ образцов

Визуализация продуктов амплификации проводится методом горизонтального гель-электрофореза в присутствии бромистого этидия. Гель-электрофорез проводится с использованием буферного раствора ТАЕ в 1% агарозном геле. Концентрированный 50× буферный раствор разводится дистиллированной водой из расчета 1 мл на 50 мл до 1× конечного раствора. Для получения 1%-го геля используется 1 гр агарозы, 75 мл дистиллированной воды и 1,5 мл концентрированного буферного раствора ТАЕ. Периодически перемешивая, смесь нагревается в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Не доводя до кипения, гель вынимается из микроволновой печи и остывает приблизительно до 40–50 0С. Далее в него добавляется 1,5 мкл бромистого этидия и заливается в форму. Для образования ячеек вставляются гребешки и гель оставляется на 20–30 мин для полимеризации.

В планшете смешивается 1,5 млк красителя бромфенилового синего и 5 мкл продукта ПЦР. В первую ячейку геля наносится 4 мкл ДНК-маркера (3 kb), затем весь каждый из продуктов ПЦР с красителем. Электрофорез проводится при напряжении в 130 В в течении ~15–20 мин. Результат определяется под ультрафиолетом на гель-документирующей системе BioRad ChemiDoc XR Sistem (BioRad)

1. Пробоподготовка
   1. Очистка продуктов амплификации

Готовится стоковая смесь. На каждый образец берется 1,5 мкл смеси. Таким образом, общий объем считается количество образцов умножить на 1.5. Для стоковой смеси берется экзонуклеаза (EXO 1) из расчета 1 мкл на 10 образцов, щелочная фосфотаза (RSAP) из расчета 2.5 мкл на 10 образцов и буфер для экзонуклеазы – 10% от суммарного объема. Доводится дистиллированной водой до полного объема. Аликвотируется в каждую пробирку с продуктами амплификации по 1.5 мкл. Образцы перемешиваются и сбрасываются капли на вортексе Microspin FV-2400 (BIOSAN). Инкубируется 40 мин при 37 °С и инактивируется 15 мин при 85 °С в термостате «Гном» (ДНК-Технология) или амплификаторе T100 Thermal Cycler (BioRad).

* 1. Постановка реакции Сенгера

Для постановки реакции Сэнгера используется коммерческий набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Подготавливается мастер-микс: 20 мкл воды, 6 мкл Buffer 5x, 1 мкл Big Dye, 1 мкл. Смесь перемешивается на вортексе Microspin FV-2400 (BIOSAN) и сбрасываются капли. В тонкостенные пробирки мастер-микс аликвотится по 28 мкл, затем добавляется 2 мкл продукта ПЦР. Образцы перемешиваются на вортексе и сбрасываются капли. На амплификаторе T100 Thermal Cycler (BioRad) выставляется программа р.Сенгера: 95 °С – 3 мин, 98 °С – 8 с, 54 °С – 10 с, 60 °С – 4 мин, 60 °С – 10 мин. Хранение –4 °С. Всего 30 циклов.

* 1. Очистка продуктов реакции Сенгера

Пробирки после хранения на –20 °С прогрели при 98 °С в течении 5мин. В 1.5 мл пробирки добавляется 2 мкл 0.5 М ЭДТА, 30 мкл продуктов р.Сенгера и 92 мкл перегнанного этанола. Тщательно перемешивается на вортексе и оставляется на 10 мин при комнатной температуре. Центрифугируется 20 мин при 13200 об/мин на центрифуге Centrifuge 5415D (Eppendorf). С помощью автоматической пипетки удаляется супернатант. Добавляется 180 мкл 75% этанола. Центрифугируется 3 мин при 13200 об/мин. Удаляется супернатант и образцы сушатся в сушильном шкафу E 28 (BINDER) при 70 °С 10–15 мин.

* 1. Секвенирование

Для разгонки образцы сиквенсной реакции передаются в специализированный ЦКП «Геномика».

1. Анализ нуклеотидных последовательностей

Обработка и анализ полученных данных проводится с использованием программного обеспечении Sequence Scanner v1.0

Идентификация культур по последовательности гена 16S rRNA осуществляется с использованием следующего оборудования:

А Оборудование для отбора проб

– Бокс бактериальной воздушной среды БАВп-«Ламинар-С» (фирма LAMSYSTEMS, Россия)

– горелка спиртовая

– микробиологическая петля

– пробирки объемом 1,5 мл

Б Оборудование для выделения геномной ДНК из образцов микробных культур

– вортекс Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Латвия)

– дозаторы емкостью 2–20 мкл (фирма HTL LABMATE+, Польша), 20–200 мкл(фирма eppendorf, Германия), 50–200 мкл(фирма GILSON Pipetman, Франция), 100–1000 мкл (фирма eppendorf, Германия)

– шейкер–инкубатор ES-20/60 (фирма BIOSAN, Латвия)

– центрифуга Centrifuge 5415D (фирма eppendorf, Германия)

–термостат «Гном» (ДНК-Технология, Россия)

– водоструйный насос

В Оборудование для проведения гель-электрофореза

**– основной блок питания PowerPac Basic (фирма BioRad, США)**

**– камера для горизонтального гель-эелектрофореза**

**– гель-документирующая система BioRad ChemiDoc XR Sistem(фирма BioRad, США)**

Г Оборудование для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)

– ПЦР-бокс DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-M-AR(фирма BIOSAN, Латвия)

– амплификатор T100 Thermal Cycler (фирма BioRad, США)

– вортекс Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Латвия)

– автоматические пипетки емкостью 1–10 мкл, 2–20 мкл, 10–100 мкл, 20–200 мкл(фирма Eppendorf, Германия),

Д Оборудование для очистки продуктов ПЦР

– амплификатор T100 Thermal Cycler (фирма BioRad, США)

– вортекс Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Латвия)

Е Оборудование для постановки р.Сенгера

– амплификатор T100 Thermal Cycler (фирма BioRad, США)

– вортекс Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия)

Ж Оборудование для очистки продуктов р.Сенгера

– вортекс Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия)

–термостат «Гном» (ДНК-Технология, Россия)

– центрифуга Centrifuge 5415D (фирма eppendorf, Германия)

– сушильный шкаф E 28 (фирма BINDER, Германия)

И Оборудование для анализа результатов секвенирования

– Персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным обеспечением или SnapGene 3.3

3.2 Стандартная операционная процедура по выделению культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: А.В. Брянская, к.б.н., с.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур по выделению культур микроорганизмов

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Выделение культур в «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» осуществляется следующим образом.

Выделение чистой культуры микроорганизмов состоит из ряда последовательных процедур:

1. получение накопительной культуры;
2. выделение чистой культуры;
3. определение чистоты выделенной культуры.

и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

– «Стандартная операционная процедура по пересеву культур»

– «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»

1 Получение накопительной культуры

1.1 Получение накопительной культуры производят, подбирая специфические питательные среды, удовлетворяющие потребности искомой группы микроорганизмов. При этом учитывается различное отношение микроорганизмов к аэрации, температуре, кислотности среды, освещению, образованию спор и т.д. В некоторых случаях для избирательного подавления роста определенной группы микроорганизмов в среды включают антибиотики.

1.2 О развитии накопительной культуры на элективной среде судят по появлению характерных признаков роста выделяемых микроорганизмов: помутнение среды, иногда сопровождаемое пигментацией, появление пленки, осадка, выделение газов.

1.3 Помимо визуального наблюдения накопительную среду микроскопируют и выявляют присутствие накопительных форм.

1.4 В некоторых случаях проводят определение продуктов метаболизма, образование которых свойственно выделяемым микроорганизмам.

2 Выделение чистой культуры

Выделение чистой культуры проводится несколькими способами: из отдельной колонии и из отдельной клетки. Для каждого случая имеются отдельные методики.

А 2.1 Выделение чистой культуры из отдельной колонии (метод Р. Коха). Метод применим для выделения аэробных микроорганизмов, которые растут на плотных средах.

2.2 При выделении чистой культуры аэробных микроорганизмов накопительную культуру высевают на поверхность плотной питательной среды.

2.3 Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную или охлажденную до 50 оС питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в чашки Петри.

2.4 На поверхность застывшей среды наносят каплю накопительной культуры или ее разведения в стерильной воде и распределяют каплю по поверхности плотной среды в чашке Петри шпателем Дригальского. Далее этим же шпателем протирают поверхность среды последовательно по второй, третьей и четвертой чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдается сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих чашках наблюдается рост изолированных колоний.

2.5 Бактериологической петлей отбирают накопительную культуру или ее разведение и на поверхности плотной среды проводят штрихи в определенном порядке (метод истощающего штриха).

2.6 После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

2.7 Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.

2.8 Выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирке или в жидкую среду.

Б 2.9 Метод глубинного посева. Метод применяется для микроаэрофильных микроорганизмов и факультативных анаэробов.

2.10 Плотную питательную среду предварительно разливают в пробирки по 15–20 мл и стерилизуют. Непосредственно перед посевом пробирки помещают в кипящую водяную баню, чтобы среда расплавилась.

2.11 Высев проводят из разведений накопительной культуры в стерильной водопроводной воде.

2.12 Разведения готовят с таким расчетом, чтобы при высеве 0,5–1,0 мл разведения получить изолированные колонии. Степень разведения определяется плотностью накопительной культуры.

2.13 Высевы делают из трех–четырех последних разведений. Для этого в пробирку с расплавленной и остуженной до 48–50 оС средой вносят 0,5–1,0 мл одного из разведений накопительной культуры. Посевной материал тщательно перемешивают, вращая пробирку между ладонями. Затем быстро выливают содержимое пробирки в стерильную чашку Петри.

2.14 После того как агаризованная среда застынет, чашки Петри помещают в термостат. 2.15 Колонии, выращенные в толще среды, вырезают стерильным скальпелем, извлекают стерильными капиллярными трубками или просто петлей и переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов.

В 2.16 Выделение облигатных анаэробов с использованием анаэростата. Для тех культур, для которых контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу же гибели клеток, посев проводят на поверхность среды в чашки Петри, и после посева чашки тотчас помещают в анаэростат.

Г 2.17 Метод разведения

2.18 Разведения накопительной культуры проводят в расплавленной и охлажденной до 45–50 оС агаризованной питательной среде. Делают 6–10 последовательных разведений. Затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем смеси парафина и вазелинового масла (в соотношении 3:1).

2.19 Либо агаризованную питательную среду после посева и тщательного перемешивания переносят в стерильные трубки Бурри или набирают в капиллярные пипетки Пастера, конец капилляра запаивают.

2.20 При удачно выбранном разведении накопительной культуры в одной из пробирок (пипеток Пастера, трубок Бурри) вырастают изолированные колонии.

2.21 Чтобы извлечь образовавшиеся колонии стерильной иглой удаляют слой парафина, а столбик агаризованной среды осторожно выдувают из пробирки в стерильную чашку Петри, пропуская газ, не содержащий кислород, через капилляр или иглу, помещенные между стенкой пробирки и агаризованной средой. Агаризованную среду из трубки Бурри выдувают, пропуская газ через ватную пробку.

2.22 В некоторых случаях плотную среду из пробирки извлекают слега нагрев пробирку, вращая ее над пламенем горелки. При этом агар, непосредственно прилегающий к стенке, плавится и содержимое пробирки в виде агарового столбика выскальзывает в стерильную чашку Петри.

2.23 Столбик агара разрезают стерильным ланцетом и извлекают колонии, захватывая их стерильными капиллярными трубками или петлей.

2.24 Изолированные колонии, полученные в капилляре, после его тщательной дезинфекции поверхности разламывают стерильным пинцетом и участки капилляра, содержащие изолированные колонии, переносят в стерильную среду.

2.25 Извлеченные колонии переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов.

2.26 Посев повторяют 2–3 раза. В качестве посевного материала при этом используют культуру, полученную из отдельной колонии.

Д 2.27 Выделение чистой культуры из одной клетки капельным методом. Метод используется при работе с грибами, цианобактериями, водорослями.

2.28 Накопительную культуру разводят в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле были одиночные клетки микроорганизмов.

2.29 Затем на поверхность нескольких стерильных покровных стекол наносят по капле приготовленного разведения. Готовят препараты «висячая капля».

2.30 Нанесенные на покровные стекла капли просматривают под микроскопом и отмечают те, в которых обнаружена только одна клетка.

2.31 Препарат помещают в термостат во влажную камеру или чашку Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне.

2.32 Через 12–24 часа отмеченные капли вновь микроскопируют.

2.33 Капли, в которых наблюдается образование микроколоний, осторожно снимают с покровного стекла кусочками стерильной фильтровальной бумаги и переносят в пробирки со стерильной средой.

3 Определение чистоты выделенной культуры осуществляется несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред.

3.1 При визуальном контроле просматривается рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды. Такой контроль осуществляется для культур, способных расти на поверхности плотных сред.

3.2 Чистоту культур проверяют высевом на питательные среды, благоприятные для их роста, в том числе на мясопептонный агар (сусло, мясопептонный бульон, картофельный агар и др.). Однородность выросших колоний свидетельствует о чистоте культуры. Если рост по штриху неоднороден, культура загрязнена.

3.3 Для контроля чистоты культур под микроскопом готовится препарат фиксированных окрашенных клеток и просматривается с иммерсионной системой. Такой контроль возможен только для культур, имеющих морфологически однородные клетки.

3.4 Готовится препарат живых клеток и просматривается с использованием фазово-контрастного устройства. Такой контроль возможен только для культур, имеющих морфологически однородные клетки.

Выделение культур осуществляется с использованием следующего оборудования:

– ламинарные шкафы (Clean Air)

– автоклавы (Sanyo)

– термостаты (Binder)

– термостатируемые качалки (Biosan)

– низкотемпературные холодильники (New Brunswick Scientific)

– микроскопическая техника ЦКП микроскопии (микроскопы световые и люминесцентные производства фирмы Zeiss).

Комплекты общелабораторного оборудования:

– наборы микропипеток

– источники питания

– холодильники

– центрифуги

– вытяжные шкафы

– анаэростат АЭ-01 и др.

3.3 Стандартная операционная процедура по созданию характеристичных масс-спектров белковых профилей микроорганизмов для внесения в базу данных «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии»

Составлено: К.В. Старостин, ст. лаборант

Содержание и назначение: определяет протокол ряда последовательных процедур по выделению культур микроорганизмов

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Создание характеристичных масс-спектров белковых профилей микроорганизмов для внесения в базу данных «Коллекции микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» производится для микроорганизмов с достоверно установленной с помощью молекулярно-генетических методов (секвенирование гена 16s р РНК или др.) таксономической принадлежностью и состоит из ряда последовательных процедур, включающих в себя отбор проб, пробоподготовку, получение масс-спектров и генерации характеристичного масс-спектра в программе Biotyper 3 и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

– «Стандартная операционная процедура по пересеву культур»

– «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»

– «Стандартная операционная процедура по выделению культур»

– «Стандартная операционная процедура по идентификации культур молекулярно-биологическими методами»

1. Отбор проб

Для создания характеристичного масс-спектра белкового профиля микроорганизма производится отбор 12 проб микробной культуры. Отбор каждой пробы производится с помощью микробиологической петли переносом 5–10 мг микробной культуры в пробирку содержащую 300 мкл деионизированной воды. Далее проба микробной культуры ресуспендируется с помощью шейкера Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия). В начале и в конце работы, а также после отбора каждой пробы микробиологическая петля обжигается в пламени горелки. Вместе с отбором проб микробных культур для идентификации проводится отбор пробы культуры *E.coli* для проведения калибровки масс-спектрометра. Отбор и пробоподготовка культуры *E.coli* проводится идентично с пробами культур для идентификации.

1. Пробоподготовка
   1. Инактивация микробных проб

К полученной суспензии добавляется 900 мкл перегнанного этанола. Смесь тщательно перемешивается на шейкере Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия) и центрифугируется 2 мин при 15600 g на центрифуге Centrifuge 5415R (фирма eppendorf, Германия). Супернатант удаляется с помощью водоструйного насоса, а осадок высушивается 3 мин с помощью вакуумного концентратора Concentrator plus (фирма Eppendorf, Германия).

* 1. Разрушение стенок микробных клеток.

Осадок микробной культуры ресуспендируется в 50 мкл 70% муравьиной кислоты.

* 1. Экстракция белковой фракции

К суспензии добавляется 50 мкл ацетонитрила, полученная смесь тщательно перемешивается и центрифугируется 2 мин при 15600 g на центрифуге Centrifuge 5415R (фирма Eppendorf, Германия). Супернатант переносится в новую пробирку с помощью микропипетки и может быть использован для масс-спектрометрического анализа или отправлен на хранение.

* 1. Хранение

Образцы хранятся при температуре –20 ⁰С до 7 суток.

1. Масс-спектрометрический анализ подготовленных образцов
   1. Нанесение образца

На масс-спектрометрическую мишень MTP 384 ground steel (фирма Bruker Daltonics, Германия) наносится 0,8 мкл подготовленной пробы микробной культуры, после высыхания на нее наслаивается 0,8 мкл матрицы (6 мг/мл α-циано-4-гидрокси-коричная кислота в системе ацетонитрил/вода/трифторуксусная кислота (50:47.5:2.5, v/v). После высыхания матрицы мишень загружается в масс-спектрометр Ultraflex III TOF/TOF (фирма Bruker Daltonics, Германия).

* 1. Получение спектров

3.2.1 Для снятия масс-спектров используется метод со следующими параметрами.

– режим: линейный позитивный.

– частота лазера: 100 Гц.

– диапазон масс (Mass range): 2 – 20 кДа.

– напряжение на электроде Ion Source 1: 25 кВ.

– напряжение на электроде Ion Source 2: 23,45 кВ.

– напряжение на линзе (Lens): 6 кВ

– параметр Pulsed Ion Extraction: 0 нс.

3.2.2 Получение масс-спектра производится накоплением 500 лазерных импульсов (пять выстрелов по 100 импульсов (Shots) по разным позициям ячейки мишени содержащей нанесенный образец). Для каждой пробы снимается три масс-спектра. В сумме для 12 проб получается серия из 36 масс-спектров.

3.2.3 Для проведения калибровки прибора снимается масс-спектр для белкового экстракта культуры *E.coli*. Калибровка проводится с использованием точных значений масс известных белков *Escherichia coli*: RL36 4365,3 Да, RS22 5096,8 Да, RL34 5381,4 Да, RL32 6315,0 Да, RL29 7274,5 Да, RS19 10300,1 Да.

1. Создание характеристичного масс-спектра белкового профиля микроорганизма проводится в программе Biotyper 3 (фирма Bruker Daltonics, Германия)

Для создания характеристичного масс-спектра белкового профиля микроорганизма используется серия из 36 масс-спектров. Для загрузки серии спектров в программе Biotyper 3 (фирма Bruker Daltonics, Германия) выбирается меню File/Ad spectra. В меню Edit>Method>MSP creation Method выбрать стандартный метод BioTyper MSP Creation Standart Method. Для создания характеристичного масс-спектра выбрать меню Action>MSP Creation>Create.

Создание характеристичных масс-спектров белковых профилей микроорганизмов осуществляется с использованием следующего оборудования:

А Оборудование для отбора проб

– Бокс бактериальной воздушной среды БАВп-«Ламинар-С» (фирма LAMSYSTEMS, Россия)

– горелка спиртовая

– микробиологическая петля

– микропипетка объемом 100–1000 мкл (фирма eppendorf, Германия)

Б Оборудование для пробоподготовки образцов микробных культур

– вакуумный концентратор Concentrator plus (фирма eppendorf, Германия)

– шейкер Microspin FV-2400 (фирма BIOSAN, Россия)

– микропипетки емкостью 10–100 мкл, 100–1000 мкл (фирма eppendorf, Германия)

– центрифуга Centrifuge 5415R (фирма eppendorf, Германия)

– водоструйный насос

В Оборудование для получения масс-спектров:

– МАЛДИ времяпролетный масс-спектрометр Ultraflex III TOF/TOF (фирма Bruker Daltonics, Германия)

– персональный компьютер, подключенный к масс-спектрометру и работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом FlexControl (фирма Bruker Daltonics, Германия).

– масс-спектрометрическая мишень MTP 384 ground steel (фирма Bruker Daltonics, Германия)

– пипетка емкостью 0,1–2,5 мкл (фирма eppendorf, Германия)

Г Оборудование для создания характеристичных масс-спектров белковых профилей микроорганизмов с помощью пакета Biotyper 3.

– Персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом BioTyper 3 (фирма Bruker Daltonics, Германия).