

**Технологический паспорт коллекции микроводорослей и
цианобактерий IPPAS
Института физиологии растений РАН**

Москва, 2017 г.

Ключевые стандартные операционные процедуры (СОП) коллекции IPPAS ИФР РАН:

Стандартная операционная процедура по подготовке стерильной посуды	3
Стандартная операционная процедура по приготовлению питательных сред	9
Стандартная операционная процедура по периодическому пересеву штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН	14
Стандартная операционная процедура по проверке аутентичности поддерживаемого фонда цианобактерий и микроводорослей	25
Стандартная операционная процедура по криоконсервации штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН.....	29
Стандартная операционная процедура по введению (депонированию) штаммов цианобактерий и микроводорослей в фонд коллекции IPPAS ИФР РАН	32
Стандартная операционная процедура по подготовке к выдаче штаммов цианобактерий и микроводорослей фонда коллекции IPPAS ИФР РАН	45
Стандартная процедура по выделению альгологически чистых штаммов цианобактерий и микроводорослей из накопительных культур	53
Стандартная операционная процедура по проверке чистоты штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН.....	57
Стандартная процедура получения аксеничных штаммов из альгологически чистых культур	59
Стандартная операционная процедура по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН	62
Стандартная операционная процедура по таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН.....	72
Стандартная операционная процедура характеристики биотехнологического потенциала штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН.....	78

Стандартная операционная процедура по подготовке стерильной посуды

Составлено: к.б.н., н.с. Мессинева Е.М., м.н.с. Козлова А.Ю., с.н.с. Маркелова А.Г., к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол подготовки стерильной посуды для работ по поддержанию коллекционного фонда.

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 5 лет

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Автоклав малый 25X

Автоклав большой MLS-3020U

Корзины для автоклава (3 шт.)

Пятиступенчатая система очистки воды методом обратного осмоса

Магистральный самопромывочный фильтр степени очистки 1 микрон Фибос

Шкаф сухожаровой FD-53

Весы РМ-200

Материалы, реактивы:

$K_2Cr_2O_7$

H_2SO_4 концентрированная

Стакан фарфоровый

Фольга плотная

Вата

Марля

Ершик

Детергент

Спирт 95%

Халат лабораторный

Перчатки нитриловые

Исполнители:

инженер

младший научный сотрудник

научный сотрудник

старший научный сотрудник

1. Подготовка новой стеклянной посуды для выращивания культур микроводорослей

1.1. Перед первичным использованием новую посуду частично (приблизительно на 1/3) заполняют водой III типа (общелабораторной), размещают в термостойких контейнерах (металлических ведрах) и стерилизуют автоклавированием* в большом автоклаве при стандартном режиме.

*Процедура использования большого автоклава подробно описана в СОП по приготовлению питательных сред, раздел 2.

1.2. Необходимо отметить в журнале автоклавирования время начала и окончания стерилизации.

1.3. После автоклавирования посуду моют хромовой смесью (хромпиком), приготовленной заранее. Процедура приготовления хромовой смеси описана в разделе 6.


1.3.1. Хромовую смесь (хромпик) наливают в каждый сосуд до 1/4-1/3 его объема, после этого осторожно смачивают его внутренние стенки. Особое внимание надо обратить на то, чтобы все внутренние поверхности, а также края посуды были смочены хромпиком. После этого остатки хромовой смеси выливаются в специализированный сосуд, в котором она хранится.

1.3.2. Обработанную хромовой смесью посуду оставляют не менее чем на 30 мин. для протекания реакции окисления. На хорошо очищенном и обезжиренном стекле вода растекается тонким слоем, не собираясь в капли.

!Все манипуляции с хромовой смесью необходимо проводить, используя вытяжную вентиляцию и защитную одежду (резиновые перчатки, халат)!

1.3.3. Хромовую смесь с посуды смывают водопроводной водой. Для полной очистки от нее стеклянную посуду необходимо прополоскать не менее 10 раз. Затем посуду ополаскивают водой III типа (общелабораторной), один-два раза.

1.4. Вымытую влажную посуду сушат в большом сушильном шкафу при температуре 150°C. Необходимо заблаговременно отметить в журнале использования сушильного шкафа время начала и окончания сушки.

Нагрев сушильного шкафа запускается длительным нажатием кнопки . Нагрев будет продолжаться до тех пор, пока температура в шкафу не достигнет 150°C (около 30-40 мин). После того, как указанная температура будет достигнута, необходимо засечь время и через 1 час выключить шкаф.

1.5. Остывшую сухую посуду достают из сушильного шкафа.

1.6. Высушенную посуду, за исключением посуды для приготовления сред, закрывают ватно-марлевыми пробками* и заворачивают в крафт-бумагу. Пробирки заворачивают в пачки по 10 штук, самые большие пробирки – по 6 штук. Пробки на колбах покрывают защитными бумажными колпачками. Упаковки пробирок и колпачки на колбах завязывают веревкой. На упаковках с пробирками карандашом указывают их размер.

*Изготовление ватно-марлевых пробок описано в разделе 6.

1.7. Подготовленную посуду помещают в большой сушильный шкаф и стерилизуют при температуре 150°C в течение 2 часов. Запуск сушильного шкафа описан выше в разделе 1.4.

1.8. Стерильную посуду помещают в соответствующие ящики тумбочки для стерильной посуды в культуральном блоке.

2. Подготовка ранее использовавшейся стеклянной посуды для культивирования. Пробирки.

2.1. Пробирки с агаризованной средой освобождают от пробок в моечной комнате или в тамбуре коллекции и помещают в кастрюлю с водопроводной водой. Необходимо следить, чтобы пробирки были полностью заполнены водой.

2.2. Кастрюлю с пробирками кипятят на плитке в течение 1 часа, чтобы расплавить остатки питательных сред.

2.3. Пробки заворачивают в крафт-бумагу и обрабатывают термически в сушильном шкафу при температуре 150°C в течение 2 часов. Просушенные пробки можно использовать второй раз, заменив марлю и верхний слой ваты. Пробки от пробирок с грибной контаминацией выбрасываются и не используются повторно.

2.4. После кипячения пробирки освобождают от остатков среды и прочих механических загрязнений с помощью ершика и водопроводной воды. Необходимо избегать попадания агара в сток раковины, жидкость с остатками среды и убитыми микроводорослями сливают в канализацию.

2.5. Очищенные механически пробирки повторно помещают в кастрюлю и заливают водопроводной водой.

2.6. Пробирки подвергают повторному кипячению в течение 1 часа.

2.7. Остывшие пробирки извлекают из кастрюли, стирают надписи 96° спиртом и моют хромовой смесью. Дальнейшая процедура аналогична таковой для новой посуды (см. разделы 1.3-1.7).

3. Подготовка ранее использовавшейся стеклянной посуды для культивирования. Колбы.

3.1. Производится убивка биологического материала в колбах автоклавированием в малом автоклаве. Для этого колбы помещают в корзину малого автоклава, и стерилизуют* 1,5 часа при 121 °С.

*Процедура использования малого автоклава подробно описана в разделе 7.

3.2. После автоклавирования жидкость с убитыми микроводорослями собирают из колб в ведро и сливают в канализацию. Колбы помещают в кастрюлю с водопроводной водой. Необходимо следить, чтобы колбы были полностью заполнены водой.

3.3. Кастрюлю с колбами кипятят на плитке в течение 1 часа, чтобы облегчить удаление засохших остатков культуры.

3.4. После кипячения колбы освобождают от механических загрязнений с помощью ершика и водопроводной воды, в случае сильного загрязнения можно использовать моющее средство (детергент), который после использования удаляется десятикратным полосканием в водопроводной воде.

3.5. Дальнейшие этапы такие же, как в разделах 1.3-1.7

4. Приготовление стеклянной посуды для стерилизации и хранения сред.

Для стерилизации и хранения сред используют бутылки с завинчивающимися крышками или колбы Эрленмейера различного объема.

4.1. Новые и использованные колбы и бутылки освобождают от механических загрязнений и агара с помощью ершика, водопроводной воды и моющего средства (детергента). Необходимо избегать попадания агара в сток раковины.

4.2. Если среда в колбах была контаминирована, осуществляется убивка, как описано в разделе 3.1.

4.3. При сильном загрязнении посуда обрабатывается хромовой смесью, как описано в разделе 1.3.

4.4. Остатки детергента или хромпика удаляются десятикратным полосканием в водопроводной воде двукратным ополаскиванием водой III типа.

4.5. Чистая посуда высушивается при комнатной температуре в сушках или в сушильном шкафу как описано в разделе 1.4.

4.6. Сухая посуда для предотвращения попадания пыли закрывается крышками (бутылки) и фольгой или пластиковыми пробками (колбы) и ставится до использования в специальный шкаф.

5. Приготовление хромовой смеси (хромпика).

Хромовая смесь — смесь концентрированной серной кислоты и дихромата калия. Она является одним из сильнейших окислителей. Не следует применять хромовую смесь в случаях загрязнения лабораторного оборудования такими веществами, как керосин, воск, парафин, минеральные масла. Необходимо избегать попадания этилового спирта в хромовую смесь.

!Приготовление хромовой смеси необходимо производить, используя вытяжную вентиляцию и защитную одежду (нитриловые перчатки, халат)!

5.1. В фарфоровый стакан помещается навеска бихромата калия. Масса бихромата калия должна быть не более 5% от массы добавляемой серной кислоты, обычно используется 3% раствор.

5.2. К бихромату калия добавляется небольшое количество серной кислоты, полученная смесь растирается стеклянной палочкой до однородного состояния.

5.3. В полученную смесь постепенно добавляют серную кислоту до необходимого объема и нагревают на плитке до полного растворения бихромата калия. Используют остывшую хромовую смесь.

5.4. Хромовую смесь хранят в закрытой фарфоровой посуде в вытяжном шкафу. Срок службы смеси достаточно велик. Индикатором пригодности может стать цвет раствора: как только раствор приобретает темно-зеленый цвет, его употребление прекращается. Повторное использование хромовой смеси приводит к ее разбавлению, раствор прекращают использовать, как только он перестает нагреваться при контакте с мокрыми стенками посуды.

6. Подготовка ватных пробок для пробирок и колб.

Чистые сухие пробирки и колбы, предназначенные для выращивания микроводорослей, закрываются ватными пробками, которые служат для предохранения культуры от заражения ее микрофлорой, находящейся в воздухе, и от высыхания. Через пробку осуществляется и газовый обмен культуры с окружающей средой.

6.1. Для приготовления пробки лучше всего брать простую плохо смачивающуюся вату, так как пробки из гигроскопической ваты легче намокают и становятся хорошей средой для обитания микробов.

6.2. Основа пробки – ватный жгут, который делается вручную путем скручивания полоски ваты. Длина и толщина жгута зависят от диаметра пробирки (или колбы).

6.3. На жгут послойно плотно наматываются небольшие полоски ваты до получения нужного диаметра. Ширина полоски должна быть равна длине будущей пробки

6.4. Небольшая ватная салфетка помещается на будущую нижнюю часть пробки.

6.5. Готовая пробка оборачивается в марлевую салфетку, помещается в подходящую пробирку (колбу), марля расправляется и затягивается в верхней части суровой ниткой. Излишки марли и ниток обрезаются. Пробка готова.

Пробка должна иметь форму цилиндра (но не коническую), 2/3 длины пробки должны входить в пробирку (или горлышко колбы). Выступающая 1/3 часть пробки должна иметь достаточный размер для удобного захвата пробки пальцами при ее извлечении.

При извлечении правильно изготовленной пробки раздается характерный звук. Ватные пробки должны быть достаточно плотными, чтобы их можно было многократно вынимать и вновь затыкать, и чтобы при этом они сохраняли свою форму.

7. Убивка стерилизацией в малом автоклаве.

7.1. Подготовка стерилизатора к работе.

7.1.1. Проверить уровень и чистоту воды в камере автоклава: нагревательный элемент должен быть покрыт водой.

7.1.2. При необходимости добавить воду III типа до необходимого уровня.

7.1.3. Если вода в камере автоклава загрязнена, ее необходимо слить, камеру промыть несколько раз водой III типа, затем заполнить ее водой III типа до необходимого уровня.

Загрязнение воды в камере или использование водопроводной воды приводит к коррозии стенок камеры.

7.2. Процесс убивки стерилизацией.

7.2.1. Поместить стерилизуемые предметы в корзину. Завинчивающиеся крышки должны быть слегка приоткрыты.

7.2.2. Включить питание кнопкой ON/OFF.

7.2.3. Закрыть крышку, поместив пароотводный шланг в специальное гнездо, равномерно привинтить крышку винтами, поднять паровой клапан.

7.2.4. Когда из клапана начнут появляться капли воды, клапан необходимо закрыть и засечь на таймере время (90 мин).

7.2.5. По окончании времени стерилизации выключить кнопку питания автоклава и дождаться, пока он остынет.

7.2.6. Когда автоклав остынет, открыть крышку и, используя защитные перчатки, вынуть из автоклава посуду с убитым материалом.

Стандартная операционная процедура по приготовлению питательных сред

Составлено: к.б.н., н.с. Мессинева Е.М., м.н.с. Козлова А.Ю., с.н.с. Маркелова А.Г., к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол подготовки питательных сред для работ по поддержанию коллекционного фонда.

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 5 лет

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Автоклав большой MLS-3020U

Корзины для автоклава (3 шт.)

Пятиступенчатая система очистки воды методом обратного осмоса

Магистральный самопромывочный фильтр степени очистки 1 микрон Фибос

Система высокой очистки воды Simplicity

Весы РМ-200

рН-метр S-40K

Мешалка магнитная MMS-300

Материалы, реактивы:

HEPES

Агар бактериологический Difco

Колбы Эрленмейера 500 мл

Фольга плотная

Бутыль стеклянная на 500 мл

Бутыль стеклянная на 1л

Стакан мерный

Цилиндр мерный

Шпатель

тарелочки для взвешивания

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Дозатор (100-1000 мкл)

Исполнители:

инженер

младший научный сотрудник

научный сотрудник

старший научный сотрудник

1. Приготовление питательных сред

В коллекции IPPAS используются как твердые (агаризованные), так и жидкие питательные среды. Прописи всех используемых сред приведены в разделе «Прописи используемых сред» на сайте коллекции IPPAS. Действующая ссылка http://www.cellreg.org/Catalog/media_list.html.

1.1. Для приготовления всех питательных сред используют только воду чистотой не ниже III типа, необходимость использования более чистой воды (II и I типа) указана в соответствующих прописях.

1.2. Для приготовления агаризованных сред в жидкие среды добавляют сухую навеску агара (Бактоагар Difco) концентрации 12-20 г/л или стерилизуют более концентрированный раствор агара в воде отдельно, а затем смешивают с минеральным раствором солей после автоклавирования (в соответствии с прописью соответствующей среды).

1.3. Для приготовления среды выбирают чистый мерный стакан соответствующего объема, заполняют его водой (0,5-0,75 конечного объема среды), на дно помещают магнит подходящего размера и ставят на магнитную мешалку.

1.4. Взвешивание реактивов осуществляют с помощью электронных аналитических весов на пластиковых подложках с точностью, указанной в прописи. Твердые реактивы отбирают для взвешивания специальными шпателями и ложками, для отбора каждого реактива используют отдельный шпатель.

1.5. Если это указано в прописи, реагенты добавляют в указанном порядке.

1.6. Большая часть сред готовится растворением сухих навесок соответствующих реактивов. Однако, некоторые среды (например, TAP, модифицированная среда A+B (Sueoka) для *Chlamydomonas* и все вариации сред BG-11) целесообразно готовить из заранее приготовленных растворов, прописи которых представлены в каталоге сред на соответствующих страницах.

1.7. В большинство сред обязательно добавляются микроэлементы, заранее приготовленные концентрированные растворы которых хранятся в холодильнике или при комнатной температуре. Соответствующие прописи растворов представлены на страницах с прописями сред. Обычно растворы микроэлементов добавляются в концентрации 1 мл раствора микроэлементов на 1 л среды.

1.8. Часть растворов нельзя подвергать термической обработке, их стерилизуют фильтрацией через фильтр с диаметром 0.2 мкм. Такие растворы добавляют стерильно после автоклавирования основной среды.

1.9. При необходимости довести рН готовой среды с помощью концентрированной серной кислоты или щелочи с использованием магнитной мешалки и рН-метра.

1.10. Готовые среды или растворы для приготовления сред помещают в чистые бутылки с завинчивающимися крышками или в колбы Эрленмейера, которые закрывают плотной фольгой. Подготовка посуды для хранения сред описана в разделе 4. Бутылки можно заполнять до максимально указанного объема, колбы Эрленмейера можно заполнять не более, чем на треть. Стерилизация должна производиться не позже, чем следующим утром после приготовления среды.

2. Стерилизация питательных сред автоклавированием.

Автоклавирование питательных сред производят в большом автоклаве.

2.1. Подготовка стерилизатора к работе.

2.1.1. Необходимо проверить выходной резервуар автоклава: уровень воды в нем должен быть между отметкой LOW и HIGH. Количество воды в выходном резервуаре увеличивается в процессе работы стерилизатора.

2.1.2. Если уровень воды за пределами этих отметок, необходимо вынуть выходной резервуар, отсоединить подводящий шланг, слить всю жидкость и заполнить резервуар водой до отметки LOW. Вставить отводящий шланг обратно, осторожно поместить резервуар в автоклав, следя за тем, чтобы подводящий шланг не перекручивался и не пережимался.

2.1.3. Проверить уровень и чистоту воды в камере автоклава: нагревательный элемент должен быть покрыт водой, вода должна быть хорошо заметна в отверстии подставки.

2.1.4. При необходимости добавить воду III типа до необходимого уровня.

2.1.5. Если вода в камере автоклава загрязнена, ее необходимо слить через сливной кран, камеру протереть чистой губкой и промыть несколько раз водой III типа, затем закрыть кран и заполнить камеру водой III типа до необходимого уровня.

Загрязнение воды в камере или использование водопроводной воды приводит к коррозии стенок камеры.

2.2. Процесс стерилизации

2.2.1. Время начала и окончания стерилизации обязательно отмечается заблаговременно в специальном журнале.

2.2.2. Поместить стерилизуемые предметы в стальные корзины. Завинчивающиеся крышки должны быть слегка приоткрыты. Разместить корзины в камере, поставив одну на другую.

- 2.2.3. Включить питание кнопкой ON/OFF. Время и температура стерилизации последовательно отображаются на цифровом дисплее.
- 2.2.4. Закрывать крышку поворотом ручки по часовой стрелке до упора, закрепить магнитный замок в его гнезде. Удостовериться, что лампочка-индикатор "Door" перестала мигать и горит постоянно.
- 2.2.5. Подавляющее большинство питательных сред и посуды стерилизуется при следующих условиях: 121 °С, что соответствует давлению пара 0,11 МПа или 1,1 атм., время стерилизации 15 минут.
- 2.2.6. При необходимости можно установить температуру стерилизации в пределах 105-126 °С. Для этого необходимо нажать кнопку установки температуры TEMP. Устанавливаемая температура стерилизации отображается на цифровом дисплее. Удерживая нажатие кнопки установки температуры TEMP, с помощью кнопок ▲UP или ▼DOWN установить необходимую температуру стерилизации. Шаг изменения температуры составляет 1°С).
- 2.2.7. Менять время стерилизации можно в пределах 1-180 минут. Для этого необходимо нажать кнопку установки времени стерилизации TIMER. Устанавливаемое время стерилизации отображается на цифровом дисплее. Для изменения времени стерилизации необходимо, удерживая кнопку установки времени стерилизации TIMER, нажимать кнопки ▲UP или ▼DOWN. Шаг увеличения установки времени стерилизации составляет 1 минуту в пределах от 1 до 30 минут и 5 минут в пределах от 30 до 180 минут. При большом суммарном объеме стерилизуемых жидких сред, время стерилизации необходимо увеличивать до 20-25 мин.
- 2.2.8. После установления режима стерилизации необходимо нажать кнопку начала стерилизации START. Короткий сигнал зуммера и срабатывание индикатора "°С" показывает, что стерилизация началась.
- 2.2.9. Цифровой температурный индикатор начинает отображать внутреннюю температуру модуля, начиная с 80°С.
- 2.2.10. Индикатор давления начинает мигать, когда температура внутри модуля достигает 98°С и давление в автоклаве начинает увеличиваться.
- 2.2.11. Когда температура внутри модуля достигает установленных параметров, включается таймер и начинает мигать индикатор таймера.
- 2.2.12. При окончании времени стерилизации звучит короткий звуковой сигнал. Температура и давление начинают снижаться. При этом мигает индикатор нагревания. Цифровое табло показывает температуру внутри блока.

- 2.2.13. Трехкратный звуковой сигнал свидетельствует о выравнивании атмосферного и внутреннего давления. Стерилизуемые предметы еще горячие, поэтому перед выемкой предметов необходимо дождаться полного окончания стерилизации и снижения температуры до 80 °С.
- 2.2.14. Когда температура внутри стерилизатора становится ниже 80 °С, пять последовательных коротких сигналов и индикатор завершения показывают, что модуль готов к открытию крышки и выемке предметов.
- 2.2.15. После этого необходимо выключить стерилизатор кнопкой ON/OFF, отсоединить магнитный держатель от его гнезда и подсоединить его к магнитной пластине рукоятки. Для открытия крышки необходимо повернуть рукоятку против часовой стрелки до упора.
- 2.2.16. Используя защитные перчатки, вынуть из модуля стальные корзины, содержащие стерильные предметы. Завинтить приотвинченные крышки на бутылках.

**Стандартная операционная процедура по периодическому пересеву штаммов фонда
коллекции IPPAS ИФР РАН**

Составлено: к.б.н., н.с. Мессинева Е.М., м.н.с. Козлова А.Ю., с.н.с. Маркелова А.Г., к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол периодического пересева штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН.

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 5 лет

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Бактерицидный проточный рециркулятор

Подставка для рециркулятора

Бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-"Ламинар-С"-1,2

Горелка Феникс II эко газовая с ножной педалью в комплекте с адаптером для газ-картриджа

Камера для роста растений Panasonic MLR-352

Камера климатическая MLR-351

Компьютер в сборе

Плитка нагревательная HG-3001 К (2 шт.)

Материалы, реактивы:

Петли микробиологические одноразовые

Петля инокуляционная Rotilabo® из сплава платины и иридия (Roth KN02.1);

Пробирка биологическая П-2-16-150

Пробирка биологическая П-2-21-200

Стеклянная пробирка, V 35 мл TX25.1 Roth

Стеклянная пробирка, V 75 мл TX26.1 Roth

Колба коническая КН-1-50-14/23

Чашки Петри пластиковые, стерильные диаметр 90 мм

Спирт 95%

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Пластырь 3М™ Micropore, белый, ширина 1,25 см

Картридж газа С206, 160 мин горения, 190 г бутана

Пипетка 10 мл, серологическая, стерильная, инд. уп.

Исполнители:

инженер

младший научный сотрудник

научный сотрудник

старший научный сотрудник

Каждая культура коллекционного фонда поддерживается в жизнеспособном состоянии методом периодических пересевов сотрудниками коллекции под контролем Куратора коллекции.

Все работы по пересеву штаммов коллекции производятся в чистом культуральном блоке в ламинарном боксе. Для работы в чистом культуральном блоке используют лабораторный халат, предназначенный только для культурального блока, и сменную обувь.

Все инструменты (петли, пипетки, пинцеты) используются только в культуральном блоке.

Для хранения сред используется отдельный холодильник, который регулярно моется детергентом, а затем протирается спиртом.

1. Подготовка культурального блока и ламинарного бокса к работе.

Ламинарный бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-"Ламинар-С"-1,2 предназначен для защиты предметов и материалов внутри рабочей камеры от внешних и перекрестных загрязнений в условиях беспылевой «чистой» воздушной среды, используется при работе с веществами, не представляющими угрозы здоровью оператора.

Ламинарный бокс находится в чистом культуральном блоке.

1.1. Мебель и пол в культуральном блоке и ламинарный бокс необходимо ежемесячно обрабатывать дезинфицирующими растворами.

Дезинфицирующий раствор готовится добавлением в воду моющего средства с ПАВ (например, «Mr. Proper») и «Белизны», содержащей гипохлорит натрия, в соответствии с инструкцией по их применению.

Все работы с дезинфицирующими средствами необходимо проводить в перчатках.

Основными способами дезинфекции являются протирание, орошение и погружение (они могут применяться по отдельности или в комбинации).

1.1.1. Протирание применяется для обработки различных поверхностей (пола, стен, потолка, дверей), мебели, оборудования. Тканевая салфетка погружается в раствор, слегка отжимается, после чего ею протирают поверхности. Обычно проводится однократно или двукратно.

1.1.2. Орошение используется для дезинфекционной обработки поверхностей помещений (преимущественно стен), проводится с помощью гидропульта или иного аналогичного приспособления: стены помещения орошаются слева направо по горизонтали, начиная сверху с последующим постепенным перемещением вниз. Для орошения используют спрей «Авансепт» или 70% раствор этилового спирта. Орошение применяется после протирания и удаления крупных загрязнений. После орошения поверхность можно протереть чистой сухой салфеткой, чтобы удалить разводы.

1.1.3. Погружение применяется для дезинфекции мелких предметов: подставок под пробирки, подставок для скошенного агара и т.п. Предметы моются с детергентом под проточной водой, потом погружаются в раствор полностью, затем вытираются насухо или сушатся в сушилке.

1.2. Перед началом работы поверхность стола в ламинарном боксе протирают 70% раствором этилового спирта и помещают в бокс все предметы, которые можно подвергать ультрафиолетовому (УФ) облучению: банки, колбы, пробирки и чашки со средами, стерильную посуду. Не следует подвергать УФ облучению пробирки, колбы и чашки с культурами, а также среды, содержащие антибиотики. Затем на 30 мин включают УФ облучение в боксе, а также УФ лампы в культуральном блоке (настенную и напольную) и закрывают дверь культурального блока. После окончания времени стерилизации отключают все УФ лампы и включают в боксе режим продувки. В ламинарный бокс заносят культуры, которые планируется пересевать. Работа в ламинаре ведется в латексных перчатках, руки обрабатывают 70% раствором этилового спирта. Необходимо повторно обрабатывать спиртом руки после каждого выноса их из стерильной зоны.

2. Разлив сред.

Разлив сред и пересев культур должны быть разнесены во времени: сначала подготавливают стерильные среды и разливают их по пробиркам, чашкам и колбам. После окончания работы бутылки, колбы из-под сред, стоковые растворы и мусор убирают из ламинара, ламинар и культуральный блок стерилизуют УФ облучением. Только после этого в ламинар вносят культуры, предназначенные для пересадки.

2.1. Подготовка сред к разливу:

2.1.1. Агаризованную среду разливают либо сразу после автоклавирования (предварительно остудив до 50-60 °С), либо достают из холодильника и нагревают на плитке до полного растворения агара, а затем остужают до 50-60 °С. При такой температуре можно удерживать емкость со средой во время

разлива. Если держать колбу горячо, на руку надевают защитную перчатку, а поверх нее латексную перчатку большего размера.

2.1.2. Жидкие среды достают из холодильника и дают им нагреться до комнатной температуры.

2.1.3. При приготовлении сред, состоящих из двух основных растворов (Аллен, Заррука), жидкий раствор немного подогревают.

2.1.4. Если среда состоит из нескольких растворов, автоклавируемых отдельно, или требуется добавка компонентов, стерилизуемых фильтрацией (микроэлементы, витамины, антибиотики), смешивание компонентов производится в ламинарном боксе, после того как посуда подготовлена к разливу (см. раздел 2.2). После добавления каждого компонента среда тщательно перемешивается. В этих случаях необходимо избегать застывания среды, так как повторный нагрев смешанной среды невозможен.

2.2. Подготовка посуды к разливу.

2.2.1. Упаковки со стерильными пробирками достают из тумбочки, пробирки выкладывают на подставку для скошенного агара (40 маленьких пробирок или 20 больших). На пробирках подписывают название сред, которые планируют в них разливать.

2.2.2. Чашки Петри достают из индивидуальных упаковок, подписывают на дне название сред, которые планируют в них разливать. Если в среду добавляется антибиотик, указывают его название и концентрацию. Чашки складывают в стопку по 5 штук.

2.2.3. С колбочек снимают защитные колпачки из крафтовой бумаги, подписывают название сред. Если в среду добавляется антибиотик, указывают его название и концентрацию.

2.3. Разлив среды.

Если среда находится в колбе, обжигают горло колбы, закрытое фольгой, снимают пинцетом фольгу и снова обжигают горло колбы. Если среда находится в банке с завинчивающейся крышкой, снимают крышку и обжигают горло банки. Агаризованную среду ставят на специальную теплоизолирующую подставку, чтобы избежать застывания агара.

2.3.1. Разлив агаризованной среды в пробирки для приготовления скошенного агара.

Для приготовления скошенного агара используют стеклянные пробирки П-2-16-150, П-2-21-200, TX25.1 Roth.

Пробирку берут в левую руку, правой вынимают пробку, плотно обхватив ее четвертым и пятым пальцами, обжигают край пробирки в пламени горелки. В правую руку берут открытую банку или колбу со средой и наливают в пробирку среду чуть меньше, чем на 1/3 от ее объема (таблица Г1). Снова обжигают край пробирки и затыкают ее пробкой. Необходимо избегать контакта пробки с какими-либо предметами в ламинарном боксе. Горло колбы или бутылки со средой время от времени обжигают в пламени горелки (после разлива каждых 4-5 пробирок). Если среда попала на поверхность пробирки, ее удаляют салфеткой, смоченной 70% этиловым спиртом. Пробирки со средой укладывают на подставку для скошенного агара таким образом, чтобы надпись с названием среды оказалась сверху. Нельзя переворачивать пробирки до застывания агара.

2.3.2. Разлив агаризованной среды в пробирки для посадки культуры уколом.

Для этого способа посадки используют широкие пробирки объемом 75 мл (TX26.1 Roth).

Среда разливается так же, как описано в разделе 2.3.1, но пробирки со средой оставляют застывать в вертикальном положении в штативе для пробирок.

2.3.3. Разлив агаризованной среды в чашки Петри.

Берут стопку из 5 чашек Петри, поднимают крышку нижней чашки вместе с остальными чашками, наливают среду таким образом, чтобы ее уровень был ниже края чашки на 2-3 мм. Закрывают крышку и поднимают крышку следующей чашки. Можно устанавливать в стопки до 15 чашек Петри. Такой способ помогает избежать образования конденсата на крышках чашек. Горло колбы или бутылки со средой время от времени обжигают в пламени горелки (после разлива каждых 3-4 чашек).

2.3.4. Разлив жидкой среды по колбочкам.

Колбочку берут в левую руку, правой вынимают пробку, плотно обхватив ее четвертым и пятым пальцами, обжигают край колбочки в пламени горелки. Наливают среду на 1/3 объема колбочки (таблица Г1), обжигают ее горлышко и затыкают пробкой. Горло колбы или бутылки со средой обжигают в пламени горелки после разлива среды в каждую колбочку.

2.3.5. Посев в колбочки с жидкой средой производится в тот же день.

Посев в пробирки может производиться как в тот же день после застывания среды, так и через 2-3 дня. Все это время пробирки хранятся в ламинарном боксе.

При необходимости можно оставить пробирки на более длительное хранение в холодильнике при +4°C, но в основном этого следует избегать, так как агар в таких пробирках в дальнейшем подсыхает быстрее.

Чашки с агаризованной средой лучше использовать на следующий день или через 2-3 дня. За это время поверхность агара подсохнет. После застывания агара чашки хранят и все манипуляции с ними производят, держа их дном вверх. Чашки с добавленными антибиотиками надо вынимать из ламинарного бокса во время стерилизации УФ облучением, так как пластик пропускает УФ лучи, и антибиотик может разрушиться под действием облучения. Для долговременного хранения чашки заклеивают специальным пластырем из нетканой вискозы, заворачивают в фольгу или пищевую пленку и хранят перевернутыми в холодильнике (4°C) сроком до 2-3 месяцев.

Таблица Г1 Расход среды в зависимости от типа посуды

Тип посуды	Количество среды
Пробирки П-2-16-150	8 мл
Пробирки GX25.1 Roth	10 мл
Пробирки П-2-21-200	15 мл
Пробирки GX26.1 Roth	20 мл
Чашки Петри (диаметр 90 мм)	50 мл
Колбы на 50 мл	20-30 мл
Колбы на 100 мл	40-50 мл
Колбы на 250 мл	75-100 мл
Колбы на 300 мл	100-125 мл

3. Подготовка культур к пересеву.

3.1. Культуры для пересева готовятся в соответствии с данными Журнала периодических пересевов (далее Журнал). Для каждого штамма в Журнале указаны шифр, название, периодичность пересева, среда для хранения, дата последнего пересева; отмечено состояние штамма и результаты теста на контаминацию после последнего пересева (описание теста дано в стандартной операционной процедуре по проверке чистоты штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS).

3.2. Периодичность пересевов устанавливается опытным путем или следует из рекомендаций депозитора штамма и может составлять от одного до шести месяцев.

3.3. Для каждой культуры подобран оптимальный световой и температурный режим подращивания и хранения, информация о котором указана в Журнале периодического пересева.

3.4. Полная информация о методах и условиях хранения, культуральных средах и периодах пересева указана в Каталоге IPPAS и паспорте штамма.

3.5. Перед подготовкой культур к пересеву в коллекции на 40 мин включают бактерицидный проточный рециркулятор.

3.6. Культуры, хранящиеся в холодильнике, перед пересевом необходимо достать и нагреть до комнатной температуры в течение нескольких часов.

3.7. Штаммы, хранящиеся в пробирках, выставляют на штативах, группируя их по типу среды. В первую очередь к пересеву следует готовить чистые культуры. Культуры, в которых ранее была отмечена бактериальная контаминация, пересеваются во вторую очередь. Работа со штаммами, в которых была отмечена грибная контаминация, проводится после завершения цикла пересевов и требует особой дезинфекции культурального блока (см. раздел 7).

3.8. Подготовленные штативы с пробирками вносят в простерилизованный ламинарный бокс, снимают с пробирок защитные колпачки и выставляют в штатив для каждого штамма по две пробирки со свежей средой. На всех пробирках подписывают шифр штамма и дату посева.

3.9. Колбочки со штаммами, хранящимися в жидкой среде, также вносятся в простерилизованный ламинарный бокс, и с них снимаются защитные колпачки. На колбочках со свежей средой подписывают шифр штамма и дату посева.

3.10. Штаммы, выращиваемые в чашках Петри, вносят в простерилизованный ламинарный бокс. Подписывают чашки со свежей средой, указывая шифр штамма и дату посева, расставляют чашки в порядке посева.

3.11. За один заход не рекомендуется сеять более 15 штаммов, чтобы избежать возможной контаминации. Если необходимо посеять в тот же день большее количество штаммов, проводят цикл стерилизации ламинарного бокса и культурального блока.

4. Пересев культур.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические петли (одноразовые и многоразовые), шпатели, пипетки.

При работе с культурами в ламинарном боксе следует:

- ничего не проносить над открытыми ёмкостями и перевёрнутыми пробками;*
- не оставлять открытыми дольше, чем это необходимо, коробки с наконечниками, банки со средами, пробирки, чашки Петри;*
- особенно внимательно относиться к тем местам у инструментов, откуда грязь способна легко проникнуть в среду;*
- не прикасаться к горлышку рядом с пробкой;*

- соблюдать разделение чистой и грязной зоны (например, слева чистая зона с подготовленными колбами со средой, посередине колбы с культурами для пересева, справа емкость для мусора).

4.1. Посев на плотные питательные среды в пробирки со скошенным агаром.

4.1.1. При посеве пробирку берут в левую руку, а правой вынимают пробку плотно обхватив ее четвертым и пятым пальцами. Обжигают край пробирки в пламени.

4.1.2. Удерживая другими пальцами правой руки петлю*, вносят ее в открытое пламя сначала в горизонтальном, а потом в вертикальном положении и прожигают до красного каления. Остужают петлю в агаре и остывшей петлей набирают посевной материал, после чего закрывают пробирку пробкой, предварительно проведя край пробирки над пламенем горелки. Пробку при этом обжигать не следует. Внимательно следят за тем, чтобы петля с посевным материалом ни к чему не прикасалась и не была близко от пламени горелки.

**Возможно использование одноразовых петель. В этом случае стерильную петлю достают из упаковки и после использования выбрасывают.*

4.1.3. Затем в левую руку берут подготовленную подписанную пробирку со свежим скошенным агаром, вынимают пробку четвертым и пятым пальцами правой руки и обжигают край пробирки.

4.1.4. Далее в пробирку вносят петлю с посевным материалом, опуская её до уровня конденсата в нижней части среды, и зигзагообразным движением распределяют посевной материал по скошенной поверхности агара.

4.1.5. Вынув петлю, обжигают край пробирки и закрывают её пробкой. Петлю тщательно прожигают в пламени горелки и ставят в штатив рукояткой вниз.

4.1.6. Повторяют ту же последовательность действий со второй пробиркой для того же штамма.

4.1.7. При переходе к пересеву следующего штамма петлю опускают в банку с 95 % этиловым спиртом и прожигают в пламени горелки.

4.2. Посев на агаризованную среду уколом.

Производится в принципе аналогично посеву на скошенный агар, за исключением того, что для забора материала используют специальный шпатель, который погружают в банку с 95% спиртом и обжигают в пламени горелки перед каждым использованием. Шпателем подцепляют кусочек культуры вместе с агаром и погружают его уколом в пробирку со свежей средой. Если отделение куса культуры в пробирке затруднено, содержимое пробирки переносят в пустую стерильную чашку Петри и отделяют нужный кусочек в ней.

При падании кусочков культуры на стол в ламинаре, его поверхность сразу же обрабатывают 70% спиртом.

4.3. Посев на плотные питательные среды в чашки Петри.

4.3.1. Выставляют на середину стола чашку, с которой будет сделан пересев, и чашку со свежей средой. Сверяют надписи на чашках и снимают с исходной чашки защитную ленту пластыря.

4.3.2. Для посева используют одноразовые петли, посев осуществляют штриховым методом.

4.3.3. Чашки держат дном вверх. Чашку Петри приподнимают настолько, чтобы в образующуюся щель свободно проходила петля. Подцепляют соскребающими движениями материал, не задевая агар, закрывают исходную чашку Петри и открывают чашку со свежей средой.

4.3.4. Петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее, и наносят микробную культуру зигзагообразными движениями (штрихом) по всей поверхности агара, не отрывая от среды.

4.3.5. Исходную чашку с культурой снова заклеивают лентой пластыря.

4.3.6. После посева всех чашек новые чашки также заклеиваются лентой пластыря.

4.4. Посев на жидкие питательные среды в колбы Эрленмейера.

Посев может производиться как петлей с твердой среды, так и пипеткой с жидкой среды.

4.4.1. Посев петлей с твердой среды.

На стерильную петлю набирают материал из пробирки или чашки, как описано выше. Затем открывают колбочку со свежей жидкой средой, обжигают ее горлышко и осторожно вносят посевной материал на бактериологической петле, легко встряхивают в верхнем слое питательной среды или растирают по стенке, смывая его жидкой средой. Обжигают горлышко снова и закрывают колбу пробкой.

4.4.2. Посев пипеткой из жидкой среды.

Открывают упаковку со стерильной градуированной пипеткой объемом 5-50 мл, но пипетку не достают. Открывают исходную культуру и колбочку со свежей средой, обжигают им горлышки. Пробки держат 4 и 5 пальцами. На пипетку надевают механическую грушу, достают пипетку из упаковки, опускают в колбу с культурой, отбирают определенное количество материала и переносят его в колбу со свежей питательной средой, внося пипетку вглубь среды, и выпускают содержащийся в ней материал. Пипетку достают из груши и откладывают в емкость для мусора, горлышки колб обжигают и закрывают пробками.

4.4.3. После окончания пересевов на все колбочки надевают защитные колпачки из крафтовой бумаги и обвязывают их ниткой.

4.5. Исходные пробирки с культурами, с которых был произведен пересев, ставят в штативы для хранения старых культур, колбочки и чашки помещают на нижние полки шкафов для хранения. Пробирки и колбы с предыдущих пересевов и те, которые не подлежат хранению, помещают в тележку для грязной посуды и затем моют, как описано в СОП по подготовке стерильной посуды.

4.6. Пробирки, чашки Петри и колбочки с пересейным материалом отмечают в Журнале, проставляя дату посева, и ставят на подращивание в условия, указанные в Журнале. Это могут быть полки с освещением различной интенсивности в коллекции, климатические камеры на 32 °С и 27 °С, качалка с освещением при комнатной температуре.

4.7. По прошествии 7-20 дней пересейные культуры проверяют на жизнеспособность: культуры, в которых замечен рост пересейного материала, отмечаются как жизнеспособные и, если указано в Журнале, перемещаются в соответствующие условия хранения (обычно в холодильные камеры с температурой +10 – 12 °С и стеклянной дверью).

4.8. Если рост культуры не наблюдается или наблюдается слабый рост, осуществляется повторный пересев с другой исходной пробирки, исследуются причины отсутствия роста и при необходимости ведется работа по подбору более подходящей среды и условий или по очистке культуры от контаминации. При этом делаются соответствующие пометки в Журнале пересевов.

5. Уборка ламинарного бокса после работы.

5.1. Из ламинарного бокса удаляются все предметы, принесенные туда извне, поверхность стола обрабатывается 70% спиртом. Включают на 30 мин УФ лампу в боксе, а также УФ лампы в культуральном блоке (настенную и напольную), закрывают дверь культурального блока. После окончания времени стерилизации отключают УФ лампы в культуральном блоке (лампа в ламинарном боксе отключается автоматически).

6. Контроль чистоты ламинарного бокса.

Контроль чистоты ламинарного бокса осуществляют ежемесячно после его уборки. Также внеочередной контроль чистоты производится после дезинфекции бокса от грибной контаминации.

6.1. В простерилизованный УФ облучением ламинарный бокс в режиме продувки вносят чашку с агаризованной органической средой (среда LB или тестовые среды на контаминацию), открывают ее и оставляют на 1 час в работающем ламинаре.

6.2. Через 1 час чашку закрывают, заклеивают лентой пластыря и ставят в термостат без освещения на 37 °С на двое-трое суток. Затем чашку оставляют еще на 2 недели в темном месте при комнатной температуре. При наличии на чашке более 3 бактериальных колоний или хотя бы одной колонии гриба, проводится процедура дезинфекции бокса (раздел 7).

7. Дезинфекция культурального блока в случае обнаружения грибной контаминации.

7.1. Все открытые упаковки с одноразовым материалом удаляются из бокса.

7.2. Остальные инструменты и предметы обрабатываются дезинфицирующим раствором (см. раздел 1).

7.3. Поверхность стола в боксе обрабатывается 70% спиртом.

7.4. В ламинарном боксе оставляют на ночь стеклянный бюкс с налитым в него 40% раствором формалина (стерилизация парами формалина). Дверь в культуральный блок при этом должна быть плотно закрыта!

7.5. На следующий день бюкс с формалином герметично закрывают и убирают в место хранения и не пользуются культуральным блоком в течение суток до выветривания паров формалина.

7.6. На третий день в культуральный блок заносят продезинфицированные предметы и новый одноразовый расходный материал. Блок готовят работе, как описано разделе 1.2 и тестируют на наличие контаминации, как описано в разделе 6.

Стандартная операционная процедура по проверке аутентичности поддерживаемого фонда цианобактерий и микроводорослей

Составлено: к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол проверки аутентичности штаммов фонда коллекции ИРРАС ИФР РАН.

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Пятиступенчатая система очистки воды методом обратного осмоса

Магистральный самопромывочный фильтр степени очистки 1 микрон Фибос

Система высокой очистки воды Simplicity

Весы РМ-200

рН-метр S-40K

Мешалка магнитная MMS-300

Амплификатор-ДНК

Вортекс Reax top Htidolph

Генератор льда Ice Flaker KF-45A

Микроскоп AxioImager D1

Насос вакуумный мембранный Milivac

Перемешиватель ротационный RM1

Спектрофотометр оптоволоконный NanoDrop 1000

Термостат (водяная баня)

Термостат (охлажд/нагр)

Трансиллюминатор ETX-20 C

Центрифуга 5415R с охлаждением

Центрифуга низкоскоростная Rotina 420R, Hettich

Система мини-электрофореза

Компьютер в сборе

Материалы, реактивы:

Стекло предметное, Heinz Herenz

Стекло покровное Roth H 873

Фенол с Трис- HCl P4557

Фенол-хлороформ для экстракции нуклеиновых кислот

Спирт 95°

RNAase A EN0531

Набор для выделения ДНК из растений GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma G2N10-1KT)

Жидкий азот

Taq PCR Kit E5000S

Пробирки на 200 мкл для ПЦР (500 шт./уп.)

Пробирки с защелкой 2,0 мл Safe Lock

Микроцентрифужные пробирки, 1.5 мл,

Наконечники 0.1-10 мкл, в башнях

Наконечники до 200 мкл, в башнях

Наконечники, до 1000 мкл в башнях

Агароза

Дозатор на 200-1000 мкл

Дозатор на 2-20 мкл

Дозатор на 0,2-2 мкл

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Исполнители:

младший научный сотрудник

старший научный сотрудник

Для подтверждения аутентичности поддерживаемого фонда цианобактерий и микроводорослей анализируют комплекс идентификационных признаков, который включает в себя морфологические, физиолого-биохимические и молекулярно-генетические характеристики. Набор характеристик для анализа подбирается индивидуально для каждого штамма на основании описаний в определителях, данных таксономических статей по соответствующим группам организмов и паспортных данных каждого штамма. При проверке аутентичности необходимо учитывать стадию роста изучаемой культуры, так как морфологические и физиолого-биохимические признаки значительно изменяются в зависимости от стадии роста.

Проверка аутентичности штаммов необходима периодически в процессе их длительного хранения методом пересевов. Проверка аутентичности с использованием морфологических и/или физиолого-биохимических характеристик производится при выдаче штаммов. Проверка с использованием молекулярно-генетических методов требуется всегда при

начале экспериментальной работы с мутантами. Также молекулярно-генетическая реидентификация требуется, если морфологических и физиолого-биохимических методов недостаточно для однозначного вывода об аутентичности штамма.

1. Анализ морфологических признаков для проверки аутентичности штаммов цианобактерий и микроводорослей

Проводится по соответствующим разделам СОП по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН и СОП по таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН. Для подтверждения аутентичности обычно анализируют макро-и микроморфологические признаки.

2. Анализ физиолого-биохимических признаков для проверки аутентичности

2.1. Пигментный состав. Анализируется согласно с соответствующими разделами СОП по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН и СОП по таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН.

2.2. Для определения аутентичности штамма может потребоваться также проверка других свойств штамма, указанных в паспорте: рост на среде с антибиотиком, способность к гетеротрофному росту, рост в экстремальных условиях и др.

3. Молекулярно-генетический анализ для проверки аутентичности штаммов цианобактерий и микроводорослей.

3.1. Выделение ДНК производят согласно с соответствующими разделами СОП по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН и СОП по таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН.

3.2. Для молекулярно-генетического подтверждения аутентичности цианобактерий используют последовательность гена 16S рРНК или 16S-23S ITS региона. Праймеры для амплификации этих последовательностей указаны в разделе 3.2 СОП по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН.

3.3. Для молекулярно-генетического подтверждения аутентичности эукариотических микроводорослей можно использовать любую из последовательностей генов 18S рРНК, хлоропластной 16S рРНК, RbcL, TufA или последовательность ITS1-5S-ITS2 региона. Праймеры для амплификации этих последовательностей указаны в разделе 3.2 СОП по таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН.

- 3.3.1. Амплифицированные последовательности разделяют электрофорезом в агарозном геле, вырезают участки геля, содержащие продукт ПЦР и выделяют ДНК из геля. Выделенную ДНК отправляют на секвенирование по Сэнгеру.
- 3.3.2. Полученные сиквенсы сравнивают с последовательностями, указанными в паспорте штамма. Для подтверждения аутентичности необходимо 100% совпадение последовательностей.
- 3.3.3. Для мутантных штаммов цианобактерий с генами, нокаутированными вставкой кассеты устойчивости к антибиотику, или содержащих вставку чужеродного гена, проводят проверку аутентичности с помощью специально подобранных праймеров, позволяющих подтвердить наличие вставки в положенном месте.

Стандартная операционная процедура по криоконсервации штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН

Составлено: к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол криоконсервации штаммов цианобактерий и микроводорослей.

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Бактерицидный проточный рециркулятор

Подставка для рециркулятора

Бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-Ламинар-С"-1,2

Горелка Феникс II эко газовая с ножной педалью в комплекте с адаптером для газ-картриджа

Морозильник -80° С MDF-U3386 S Sanyo

Плитка нагревательная HG-3001 K

Пятиступенчатая система очистки воды методом обратного осмоса

Магистральный самопромывочный фильтр степени очистки 1 микрон Фибос

Система высокой очистки воды Simplicity

Весы РМ-200

Мешалка магнитная MMS-300

Материалы, реактивы:

Петли микробиологические одноразовые

Микроцентрифужные пробирки, 1.5 мл

Пробирки 50 мл, PlugSeal, стерильные

Наконечники до 200 мкл, в башнях

Наконечники до 1000 мкл в башнях

Глицерин

DMSO D4540 100ML

Агар бактериологический Difco 454 г

Колба коническая КН-1-50-14/23

Чашки Петри пластиковые, стерильные диаметр 90 мм 10 шт/ уп.

Спирт 95%

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Картридж газа С206, 160 мин горения, 190 г бутана

Пипетка 10 мл, серологическая, стерильная, инд. уп.

Исполнители:

младший научный сотрудник

старший научный сотрудник

1. Замораживание.

1.1. Для замораживания используют культуру, выращенную в колбочке на жидкой среде до поздней линейной фазы. Все манипуляции с культурой производят в ламинарном боксе с соблюдением условий стерильности (см. СОП по периодическому пересеву штаммов фонда коллекции IPPAS)

1.2. Культуру переливают в пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 50 мл и центрифугируют при комнатной температуре и 4500 g в течение 10 мин.

1.3. Сливают супернатант, промывают осадок свежей средой и снова осаждают клетки.

1.4. Сливают супернатант и добавляют среду с добавлением криопротектанта. В качестве криопротектантов в основном используются 1-10% растворы метанола, DMSO и 10-50% раствор глицерина. Криопротектант подбирается индивидуально для каждого штамма.

1.4.1. Пример приготовления 12 мл 10% раствора глицерина. Смешать 10.5 мл среды с 1.5 мл стерильного 80% раствора глицерина.

1.4.2. 80% глицерин стерилизуют автоклавированием после каждого использования, DMSO и метанол стерилизовать не требуется.

1.5. Клетки тщательно ресуспендируют в растворе криопротектанта вортексированием или пипетированием.

1.6. Полученную суспензию разливают по стерильным эппендорфам. В эппендорфы объемом 1,5 мл добавляют 1,2 мл суспензии клеток, в эппендорфы объемом 2 мл добавляют 1,6 мл суспензии.

1.7. Эппендорфы подписывают несмываемым маркером, обозначая штамм, дату криоконсервации, криоконсервант и его концентрацию.

1.8. Эппендорфы с суспензией клеток в подставке помещают в полистиреновую коробку и ставят в морозильную камеру на -70 °С. Полистиреновая коробка обеспечивает плавное снижение температуры.

1.9. Через 2-3 часа эппендорфы перемещают в коробку для хранения и заносят информацию о месте их хранения и дате замораживания в коллекционный журнал.

2. Размораживание

- 2.1. Имеет смысл проверить жизнеспособность замороженных культур через месяц и далее раз в год. В случае значительного снижения жизнеспособности замораживают свежую культуру.
- 2.2. Все процедуры с размораживаемой культурой производят в условиях стерильности при низкой освещенности. Эппендорф с культурой достают из места хранения при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, переносят во льду к водяной бане, нагретой до $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. В нее помещают эппендорфы до полного растворения кристаллов льда. Не следует допускать нагревания суспензии. Затем эппендорф снова помещают в лед.
- 2.3. Суспензию клеток переносят из эппендорфа в пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой и постепенно (в течение 30-60 мин), чтобы избежать осмотического шока, разбавляют свежей средой до 50 мл.
- 2.4. Затем клетки центрифугируют и промывают свежей средой, как описано в пунктах 1.2 и 1.3.
- 2.5. Затем клетки снова разбавляют свежей средой и переносят в стерильную колбочку, которую изолируют от света и помещают на оптимальную для культуры температуру. Через 2 дня колбу перемещают в условия слабой освещенности и затем в условия нормальной освещенности.
- 2.6. Если культура хорошо переносит замораживание, можно сразу после промывки посадить ее на чашку Петри с твердой средой.

**Стандартная операционная процедура по введению (депонированию) штаммов
цианобактерий и микроводорослей в фонд коллекции IPPAS ИФР РАН**

Составлено: к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол депонирования штаммов цианобактерий и микроводорослей в фонд коллекции IPPAS ИФР РАН

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Бактерицидный проточный рециркулятор

Подставка для рециркулятора

Бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-Ламинар-С"-1,2

Горелка Феникс II эко газовая с ножной педалью в комплекте с адапетром для газ-картриджа

Компьютер в сборе

Плитка нагревательная HG-3001 K

Материалы, реактивы:

Петли микробиологические одноразовые

Петля инокуляционная из сплава платины и иридия

Агар бактериологический Difco

Пробирка биологическая П-2-21-200

Колба коническая КН-1-50-14/23

Чашки Петри пластиковые, стерильные диаметр 90 мм

Спирт 95%

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Картридж газа С206, 160 мин горения, 190 г бутана

Исполнители:

младший научный сотрудник

старший научный сотрудник

1. Подготовка документов для приема штаммов цианобактерий и микроводорослей на
хранение в коллекцию IPPAS ИФР РАН.

1.1. Руководитель коллекции IPPAS принимает письмо организации-депозитора с просьбой о депонировании и высылает условия депонирования (Приложение 1) и пакет документов,

которые депозитор должен заполнить, (заявление о депонировании – Приложение 2; паспорт на культуру – Приложение 3).

1.2. Заявление о депонировании должно быть подписано депозитором, руководителем организации-депозитора или иным лицом, уполномоченным на это учредительными документами юридического лица, с указанием его должности. Подпись скрепляется печатью юридического лица.

Заявление должно содержать:

- полное и сокращенное название организации-депозитора,
- юридический и фактический адреса, адрес для переписки и телефон контактного лица с указанием его имени, отчества и фамилии;
- указание целей депонирования (хранение или депонирование осуществляется для целей национальной патентной процедуры);
- название депонируемого штамма цианобактерии или микроводоросли;
- опознавательный шифр, присвоенный штамму депозитором

1.3. Паспорт высылается руководителю коллекции IPPAS на проверку. После подтверждения правильности его заполнения, паспорт должен быть подписан депозитором и утвержден руководством его организации с подписью и печатью. В коллекцию высылается как электронная версия паспорта (в формате Word), так и подписанный бумажный оригинал.

Паспорт должен в обязательном порядке содержать следующую информацию:

- наименование организации-депозитора с указанием почтового адреса;
- состав авторского коллектива;
- происхождение или способ получения штамма;
- таксономическое наименование штамма и его описание;
- состав сред и описание условий, необходимых для культивирования и хранения штамма;
- указание свойств штамма, являющихся основанием для приема штамма в коллекцию IPPAS и/или предметом национальной патентной процедуры.

1.4. По информации, представленной в паспорте, руководитель коллекции IPPAS принимает решение о возможности или отказе депонировать штамм. На этом этапе отказ в депонировании может быть обусловлен следующими причинами:

- поддержание штамма требует условий, которые коллекция IPPAS технически не способна обеспечить;
- штамм недостаточно охарактеризован, чтобы сделать вывод о возможности его биотехнологического применения.

2. Прием штамма на хранение.

2.1. Руководителем коллекции назначается сотрудник, ответственный за прием штамма.

2.2. На основании информации, предоставленной в паспорте, сотрудник готовит посуду и среды, необходимые для приема штамма и его тестирования.

2.3. Ответственный сотрудник принимает штамм в двух экземплярах, предпочтительно в пробирках или на чашках Петри на твердой среде, возможен также прием штамма на жидкой среде. Депозитор должен гарантировать жизнеспособность переданного штамма в течение 1 месяца после передачи.

2.4. Сотрудник, ответственный за депонирование данной культуры, проводит тестирование культуры на жизнеспособность и на контаминацию. Проверку жизнеспособности производят в соответствии с разделом 4.7 СОП по периодическому пересеву штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН. Тестирование на контаминацию производят согласно СОП по проверке чистоты штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН. Процедура тестирования должна быть завершена в течение месяца после поступления штамма.

2.5. Если полученная культура не содержит жизнеспособного штамма цианобактерии или микроводоросли, указанного в заявлении, либо отличается от описания в паспорте, либо загрязнена мицелием плесневых грибов, простейшими, другими микроводорослями или бактериями (бактериальная контаминация допускается, если она не затрудняет рост культуры микроводоросли или цианобактерии), депозитору высылают отказ в депонировании культуры с обоснованием. Депозитор может позже представить депонируемый штамм в надлежащем качестве.

2.6. Если культура прошла проверку на чистоту и жизнеспособность с положительным результатом, ответственный за депонирование сотрудник проводит регистрацию культуры в коллекции.

2.6.1. Присваивает депонированному штамму уникальный коллекционный шифр и вносится его в список коллекционных культур.

2.6.2. Проставляет шифр и дату депонирования в паспорте депонированного штамма (в электронной и бумажной версии). Дата депонирования культуры устанавливается по дате поступления в коллекцию жизнеспособного штамма, не содержащего загрязнения, и комплекта вышеперечисленных документов.

2.6.3. Заводит на штамм электронная карточка, в которую вносит известная информация о культуре:

- Шифр штамма в коллекции
- Название штамма
- Автор последнего определения и год
- Изолятор штамма, оригинальный номер и название штамма

- Место и способ выделения (если выделен из природы – краткая географическая характеристика: страна, ближайший населенный пункт, биотоп, географические координаты), год выделения
- Если штамм отселектирован из другого – информация об исходном штамме, признак по которому шла селекция, способ селектирования
- Если штамм является мутантным, информация об исходном штамме, способе получения мутации, ее локализации, фенотипическом проявлении, идентификации
- ФИО депозитора, название организации
- Другие названия штамма
- Присутствие штамма в других коллекциях
- Аксеничность
- Размножение (указывается наличие полового размножения)
- Среда хранения и культивирования
- Экофизиологические характеристики
- Применение
- Примечания
- Ссылка на последовательности данного штамма в базе данных Genbank NCBI
- Библиография

2.6.4. Вносит данные о культуре в рабочий Журнал пересевов.

2.6.5. Выделяет культуре постоянное место хранения.

2.6.6. Оформляет справку о депонировании (Приложение 4) в трех экземплярах, подписывает их у руководителя коллекции и директора ИФР РАН и передает депозитору два экземпляра, а одну копию оставляет в коллекции.

2.6.7. Собирает бумажные оригиналы всех документов на этот штамм (заявление на депонирование, паспорт штамма, справка о депонировании) и помещает их в папку «Депонирование».

2.6.8. Если штамм был передан на хранение с возможностью передачи его распространения, информация о штамме заносится в электронный каталог.

Приложение 1

Условия депонирования штаммов в коллекции IPPAS ИФР РАН

Коллекция IPPAS принимает на хранение и депонирует для национальной патентной процедуры штаммы цианобактерий и микроводорослей, имеющие потенциал для применения в биотехнологии. Коллекция IPPAS выдает соответствующую справку о депонировании (в прикрепленном файле образец такой справки).

Условия прием штамма в коллекцию:

- штамм должен быть альгологически чистым (получен из одной колонии)
- мы не депонируем и не принимаем на хранение штаммы с грибной контаминацией
- мы не депонируем и не принимаем на хранение штаммы, контаминированные простейшими и беспозвоночными
- контаминированность штамма должна быть отмечена в паспорте и при передаче культуры (необходим тест на органической среде, например на среде выращивания штамма с добавлением глюкозы и казеиновой кислоты).
- в случае сильной бактериальной загрязненности мы оставляем за собой право отказаться от депонирования культуры

Для проведения процедуры депонирования необходимо:

1. Заполнить заявление на передачу штаммов для депонирования, выслать его электронную копию с подписью и печатью дирекции.
2. Заполнить паспорт на ваш штамм (штаммы) (все графы, по которым есть информация)
3. Выслать электронную копию заполненного паспорта руководителю коллекции
4. После подтверждения правильности заполнения паспорта подписать его в дирекции и поставить печать. Выслать электронную копию финальной версии паспорта.
5. Заполнить поля с вашими данными в справке и выслать ее руководителю коллекции.
6. Передать нам культуру вместе с оригиналом заявления, распечатанным паспортом с подписью и печатью вашей дирекции.
7. После получения штамма мы проводим тест на контаминацию (на среде выращивания штамма с добавлением глюкозы и казеиновой кислоты), проверяем культуру микроскопированием, проводим один пассаж вашего штамма с целью проверки его жизнеспособности. Это занимает один месяц. Если штамм проходит тест и нет проблем с его ростом, мы депонируем штамм и выдаем (высылаем) вам соответствующую справку.

Приложение 2

Бланк заявки на передачу штамма на хранение в коллекцию IPPAS ИФР РАН

ФГБУН Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
руководителю Коллекции IPPAS
Синетовой М.А.

ЗАЯВКА НА ПЕРЕДАЧУ ШТАММА НА ХРАНЕНИЕ В КОЛЛЕКЦИЮ IPPAS

Организация (название организации) просит принять на хранение/ депонирование в связи с национальной патентной процедурой (оставить нужное) штамм цианобактерии/микроводоросли (видовое название штамма, обозначение) в целях его длительного сохранения.

Указанный штамм микроорганизма не является патогенным для человека и животных.

Полное наименование организации-заказчика	
Краткое наименование организации-заказчика (если оно есть)	
Почтовый адрес организации заказчика	
Должность, ФИО заказчика/ков (на кого будет оформляться справка)	
Контактное лицо, телефон, факс	
Контактный адрес электронной почты	

ФИО руководителя организации или его заместителя, подпись, число

Печать организации

Приложение 3

Образец паспорта штамма микроскопической водоросли, передаваемого на депонирование при подаче заявки на изобретение

"УТВЕРЖДАЮ" М.П. _____

руководитель организации-депозитора

Ф. И. О.

"__" _____ 20__ г.

П А С П О Р Т

штамма микроскопической водоросли,
передаваемого на депонирование при подаче
заявки на изобретение

Индекс и номер штамма, присвоенный в
IPPAS (Коллекции микроводорослей ИФР
РАН)

IPPAS _____

I.....

1. Наименование организации, где был получен штамм:

2. Автор или авторский коллектив, подающий заявку:

Ф. И. О.

3. Почтовый адрес заявителя:

4. Авторское наименование штамма, шифр: ...

5. Дата получения штамма заявителем:

6. Получен в IPPAS от

Ф. И. О.

дата получения

7. Шифр штамма в других коллекциях, если штамм был где-либо еще депонирован:

II. Номенклатурные данные

Филум:

Род:

Вид:

Подвид:

Кем идентифицирован:

когда:

Идентифицирован по (библиографическая ссылка на определитель)

III. Происхождение штамма

1. Выделен:

а) из природы (водоём, почва и др.)..

.....

географическое положение

б) из смешанной культуры:

в) из производственной установки

г) кем выделен:

способ выделения:

дата:

2. Отселектирован в результате скрининга на (признак):

по

кем:

сведения об исходном штамме:

опознавательная ссылка, место хранения(коллекция)

способ выделения:

дата

3. Создан генетически (генно-инженерным методом) ДА/НЕТ

сведения об исходном штамме:

опознавательная ссылка, место хранения(коллекция)

способ создания:

среда:

мутаген:

условия воздействия:

маркерный признак:

кем получен:

дата:

IV. Аксеничность штамма

Степень чистоты:

Способы проверки:

V. Физиологические свойства штамма

I. Оптимальные условия выращивания:

а) наименование и состав среды (необходимо указать протокол приготовления среды: готовится среда навесками или из стоковых растворов; нужно ли стерилизовать какие-то компоненты отдельно, все ли компоненты можно автоклавировать и другую важную с вашей точки зрения информацию)

рН в начале культивирования

в конце культивирования

б) источник CO₂ (газо-воздушная смесь, бикарбонат, мочевины)

% CO₂ в ГВС.....скорость барботажа (л/мин)

другие условия:

в) температура:

г) освещение: круглосуточное

периодическое.....свет.....темнота

д) освещённость (Вт/м² или моль квантов света на м² в сек):

тип ламп: люминесцентные, накаливания, рефлекс, др. (указать)

2. Продуктивность в оптимальных условиях культивирования:

а) по накоплению биомассы (сухой вес, мг/мл в сутки):

б) скорость роста: μ :.....сутки⁻¹;..... млн/мл в сутки

в) выход полезного продукта: мг/сутки на мг биомассы

3. Биохимический состав в оптимальных условиях культивирования:

вещества(%):

а) белок

б) углеводы:

в) липиды:

г) другие соединения:

4. Устойчивость культуры:

а) сезонность:

б) бактерицидность (устойчивость к контаминации):

в) автолиз:

г) агглютинация:

VI. Биотехнологическая характеристика штамма

1. Название продуцируемого вещества или другое свойство штамма, послужившее основанием для подачи заявки.....

Формула заявки:

2. Условия культивирования, обеспечивающие максимальный уровень (выход) полезного свойства (продукта):

а) наименование и состав среды:

Состав среды:

pH

б) углеродное питание.....

источник CO₂:

состав ГВС:

скорость барботажа:

в) температура:

г) освещение:

д) освещенность: одностороннее, или двухстороннее,

тип ламп:

е) действующий фактор при направленном биосинтезе:

ж) изменения в биохимическом составе:

4. Продуктивность при максимальном выходе продукта:

а) сухой вес (мг/мл в сутки):

б) скорость роста, μ (млн. сутки):

в) выход продукта (мг/сутки на мг сухого веса):

5. Стабильность полезного свойства:

способ тестирования:

6. Бактерицидные свойства:

VII. Условия поддержания в коллекции

1. Среда

а) агаризованная: % агар-агар или бакто-агар
состав среды

б) жидкая:

2. Условия подращивания.

а) температура:

б) освещенность:

3. Условия хранения:

а) температура

б) освещённость

4. Частота пересева.

а) оптимальный срок хранения:

б) максимальный:

5. Проверка степени чистоты:

VIII. Консервация

1. Метод:

2. Материал

а) суспензия:

б) агаровый блок:

в) сухая культура:

3. Условия консервации

а) температура:

б) протектор:

4. Условия хранения:

а) температура:

б) срок хранения:

максимальный:

5. Режим реактивации:

IX. Морфологическая характеристика

1. Характер роста на среде хранения:

2. Цитологическое описание:

а) форма клеток. _____ размер _____

б) пиреноид _____ размер _____

в) хроматофор (форма, цвет):

г) наличие жгутиков и другие особенности:

д) особенности морфологии при длительном хранении:

е) особенности морфологии в условиях оптимального роста:

ж) особенности морфологии в условиях, обеспечивающих максимальный выход продукта:

з) рисунок (фото или схема)

X. Другие особенности штамма:

XI. Способ проверки жизнеспособности:

XII. Другие данные о штамме (например, номера доступа в секвенированных последовательности генома, транскриптома в базах данных)

XIII. Кем и когда заполнен паспорт:

Кем..... когда.....

XIV.

1. Кем принят паспорт в коллекцию.....

2. Кем принят штамм в коллекцию.....

Дата:

Сдал /подпись/

Принял/подпись/

Руководитель коллекции

Приложение 4

Образец справки о депонировании штамма в коллекции микроводорослей IPPAS ИФР РАН

КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ (IPPAS)
127276, Москва, И-276, Ботаническая ул. 35, ИФР РАН
e-mail: maria.sinetova@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

С П Р А В К А*

о депонировании штамма в коллекции микроводорослей
IPPAS ИФР РАН

Наименование депонированного штамма:

род и вид в латинской транскрипции, авторское наименование штамма

Заявитель:

Адрес заявителя:

Авторы изобретения:

ФИО авторов

Название изобретения:

НАПРИМЕР: Штамм одноклеточных водорослей *Dunaliella salina* IPPAS 295 - продуцент биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной и антагонистической активностью в отношении условно-патогенных бактерий

Назначение штамма:

Дата депонирования:

_____ 20__ г.

Регистрационный номер, присвоенный депонированному штамму:

IPPAS _____

Директор Института,
д.б.н., проф.

Д.А. Лось

Руководитель коллекции,
к.б.н.

М.А. Синетова

(*). Справка прилагается к описанию изобретения на штамм, культуру микроводорослей, способ получения веществ биотехнологическим путем, вещество, полученное биотехнологическим путем и т.п. для патентной процедуры

**Стандартная операционная процедура по подготовке к выдаче штаммов
цианобактерий и микроводорослей фонда коллекции IPPAS ИФР РАН**

Составлено: к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол выдачи штаммов цианобактерий и микроводорослей из фонда коллекции IPPAS ИФР РАН

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Бактерицидный проточный рециркулятор

Подставка для рециркулятора

Бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-Ламинар-С"-1,2

Горелка Феникс II эко газовая с ножной педалью в комплекте с адапетром для газ-картриджа

Компьютер в сборе

Плитка нагревательная HG-3001 K

Материалы, реактивы:

Петли микробиологические одноразовые

Петля инокуляционная из сплава платины и иридия

Агар бактериологический Difco

Пробирка биологическая П-2-21-200

Колба коническая КН-1-50-14/23

Чашки Петри пластиковые, стерильные диаметр 90 мм

Спирт 95%

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Картридж газа С206, 160 мин горения, 190 г бутана

Исполнители:

младший научный сотрудник

старший научный сотрудник

1. Подготовка документов для выдачи штаммов цианобактерий и микроводорослей фонда
коллекции IPPAS ИФР РАН.

1.1. Коллекция предоставляет штаммы своего фонда для исследовательских и учебных целей научным и образовательным учреждениям на основании правил выдачи штаммов

(Приложение 1) и заявления от этих учреждений (Приложение 2). Депонированные штаммы предоставляются только по разрешению депозитора.

1.2. Заявитель, желающий получить штамм из фонда коллекции IPPAS ИФР РАН, составляет запрос в произвольной форме и отправляет его на электронную почту руководителя коллекции. Руководитель коллекции подтверждает возможность получения запрошенного штамма или предлагает альтернативу. Когда выбор штаммов определен, заявитель заполняет заявку на предоставление штамма.

1.3. Заявка на предоставление штамма должна быть полностью заполнена и подписана в дирекции учреждения. Подготовка штаммов к выдаче начинается после получения скана подписанной заявки с печатью организации. Бумажную копию заявитель отправляет почтой или передает при получении штамма.

Заявка должна содержать:

- полное и сокращенное название организации-депозитора,
- юридический и фактический адреса, адрес для переписки и телефон контактного лица с указанием его имени, отчества и фамилии;
- список штаммов, которые заявитель планирует получить (полное наименование, шифр в коллекции)
- указание целей приобретения штаммов;
- подтверждение, что штаммы не будут использоваться в коммерческих целях.

2. Подготовка штаммов к выдаче.

2.1. Руководителем коллекции назначается сотрудник, ответственный за выдачу штаммов по каждой конкретной заявке.

2.2. Ответственный сотрудник готовит посуду и среды, необходимые для посева запрошенных штаммов и их тестирования.

2.3. Для подготовки штамма к выдаче ответственный сотрудник берет один из последних по времени пересева вариантов штамма из хранения (обычно штаммы хранятся в двух экземплярах) и высевает его в двух повторностях – одна для передачи, вторая для замены экземпляра из хранения. Также делается тестовый посев на контаминацию и отбирается проба для микроскопирования с целью подтверждения аутентичности передаваемых штаммов. Тестирование на контаминацию производят согласно СОП по проверке чистоты штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН.

2.4. Через 10-14 дней штамм обычно готов к выдаче, о чем сообщают заявителю.

2.5. Доставку штамма организует заявитель.

2.6. Вместе со штаммом заявителю выдается документ (Приложение 3), содержащий наиболее важные паспортные характеристики штамма, заверенный подписью руководителя коллекции, директором ИФР РАН и печатью.

2.7. При передаче штамма представители коллекции IPPAS и заявителя подписывают Акт о передаче культур (Приложение 4).

Приложение 1

Условия выдачи штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН

Коллекция предоставляет штаммы своего фонда для исследовательских и учебных целей научным и образовательным учреждениям. Необходимым условием предоставления коллекционных штаммов является наличие у организации технических возможностей для работы с микроорганизмами (коллекция может запросить соответствующее письменное подтверждение). Штаммы предоставляются на скошенном агаре в пробирках, в чашках Петри или в жидком виде (40 мл культуры в стерильной пластиковой пробирке с закручивающейся крышкой) в зависимости от штамма. Все предоставляемые штаммы альгологически чистые, но аксеничность мы не гарантируем. Доставку мы не организуем, возможен только самовывоз. Время подготовки штаммов 2 недели со дня получения официальной заявки на получение штамма. При заказе свыше 5 штаммов время подготовки может увеличиться до 1 месяца.

Форму заявки прилагаю. Для того, чтобы заявка была принята, необходимо ее заполнить и выслать скан подписанной заявки с печатью организации на мою почту. Бумажную копию можно выслать обычной почтой или передать при получении штамма.

Приложение 2

Образец заявки на предоставление штамма

ФГБУН Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
руководителю Коллекции IPPAS
Синетовой М.А.

ЗАЯВКА НА ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ШТАММА

Прошу предоставить следующие штаммы:

наименование штаммов

с целью _____

Подтверждаю, что полученные штаммы не будут использованы в коммерческих целях.

Полное наименование организации-заказчика	
Краткое наименование организации-заказчика (если оно есть)	
Почтовый адрес организации заказчика	
Должность, ФИО заказчика (на кого будет оформляться паспорт)	
Контактное лицо, телефон, факс	
Контактный адрес электронной почты	

ФИО руководителя организации или его заместителя, подпись, число

Печать организации

Приложение 3

Пример паспорта выдаваемого штамма.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК Ордена Трудового Красного Знамени УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ им. К.А. Тимирязева РАН 127276, Москва, И-276, Ботаническая ул., 35 Тел. 977-80-22, Факс 977-80-18 E-mail: ifr@ippras.ru 00.00.2017 г. № 12313/9311- На № _____	Название учреждения Должность ФИО Адрес: Тел.: , Факс: E-mail:
---	---

Паспортные характеристики штамма *Synechocystis* sp. IPPAS B-1400 из Коллекции культур
микроводорослей ИФР РАН

Название: *Synechocystis* sp. Sauvageau

Регистрационный номер в коллекции IPPAS: IPPAS B-1400

Штамм: GT-L

Выделен: пресноводный водоем в Окленде, Калифорния, США, R. Kunisawa, 1968 г.

Последнее определение: Rippka R., 1979

Поступил: Япония, от N. Murata через Лося Д.А., 2005 г.

Характеристика: нейтрофил, мезофил, светолюбивый, автотроф, способен к гетеротрофному росту.

Среда: BG-11 (Приложение 1)

Область применения: фундаментальные исследования.

Генетическая модификация/мутация: нет.

Патогенность: штамм не является патогенным, не может нанести вреда человеку, животным, окружающей среде, не требует специальных условий культивирования.

Библиография: Zavřel T., Sinetova M.A., Búzová D., Literáková P., Červený J. (2015)

Characterization of a model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 autotrophic growth in a flat-panel photobioreactor. *Engineering in Life Sciences* 1: 122-132. doi: 10.1002/elsc.201300165

Зам. директора ИФР РАН

доктор биологических наук

Руководитель группы экофизиологии микроводорослей

И.Е. Мошков

с Коллекцией IPRAS ИФР РАН

канд. биол. наук

М.А. Синетова

Приложение 4

Бланк акта о передаче культур(ы) из коллекции микроводорослей ИФР РАН (IPRAS)

КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ (IPRAS)

127276, Москва, И-276, Ботаническая ул. 35, ИФР РАН

e-mail: maria.sinetova@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

АКТ

о передаче культур(ы) из коллекции микроводорослей
ИФР РАН (IPRAS)

В организацию _____

в соответствии с заявкой от _____

переданы следующие культуры:

№	Шифр в коллекции	Наименование культуры	В каком виде передана культура	Количество	Примечания

Культуру получил (ФИО, должность):

Культуру передал (ФИО, должность):

О полученных ростовых, продукционных характеристиках и использовании биомассы в исследовательских и хозяйственных целях, а также о публикациях просьба информировать сотрудников коллекции IPRAS ИФР РАН.

Подпись сотрудника коллекции IPRAS ИФР РАН:

Подпись сотрудника организации:

Дата

Руководитель коллекции IPRAS ИФР РАН, с.н.с., к.б.н.

Синетова М.А.

**Стандартная процедура по выделению альгологически чистых штаммов
цианобактерий и микроводорослей из накопительных культур**

Составлено: к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол выделения альгологически чистых штаммов
цианобактерий и микроводорослей из накопительных культур

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 5 лет

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Бактерицидный проточный рециркулятор

Подставка для рециркулятора

Бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-Ламинар-С"-1,2

Горелка Феникс II эко газовая с ножной педалью в комплекте с адаптером для газ-картриджа

Компьютер в сборе

Плитка нагревательная HG-3001 К

Камера для роста растений Panasonic MLR-352

Камера климатическая MLR-351

Шейкер GFL 3015

Материалы, реактивы:

Петли микробиологические одноразовые

Петля инокуляционная из сплава платины и иридия

Агар бактериологический Difco

Пробирка биологическая П-2-21-200

Колба коническая КН-1-50-14/23

Чашки Петри пластиковые, стерильные диаметр 90 мм

Спирт 95%

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Картридж газа С206, 160 мин горения, 190 г бутана

Исполнители:

младший научный сотрудник

старший научный сотрудник

Альгологически чистой называют культуру, в которой содержатся клетки одного штамма микроводоросли или цианобактерии, но при этом могут содержаться клетки бактерий и грибов.

Подробное описание различных методов выделения чистых культур цианобактерий и микроводорослей можно найти по следующим ссылкам:

Algal Culturing Techniques. Andersen, RA, (ed.) Academic Press, Boston, USA, 2005. –578 p.

Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). – Кострома: Костромской печатный дом, 2014. – 215 с

Ниже дано описание наиболее универсальных методов, используемых в коллекции IPPAS

1. Метод последовательного разведения.

1.1. Из накопительной культуры готовят серию последовательных десятикратных разведений. Для этого в 4-7 стерильных эппендорфы наливают по 900 мкл среды. В первый эппендорф добавляют 100 мкл исходной культуры, тщательно перемешивают суспензию пипетированием и переносят 100 мкл в следующий эппендорф. Процедуру повторяют до последнего эппендорфа.

1.2. Выбирают последний эппендорф, в котором суспензия микроводорослей дает окрашивание среды. На следующих этапах используют этот и 2-3 следующих эппендорфа.

1.3. В подготовленные, подсушенные в термостате и подписанные чашки со средой (можно подготовить чашки с несколькими вариантами среды, например для выделения азотфиксирующих цианобактерий использовать вариант среды без добавления соединений азота) добавляют по 100 мкл суспензии, начиная с самого большого разбавления. Из одного эппендорфа имеет смысл делать посев в 2-3 чашки.

1.4. Суспензию аккуратно втирают в агар с помощью стерильного шпателя Дригальского.

1.5. Дают суспензии как следует впитаться в поверхность агара, чашки переворачивают и заклеивают специальным пластырем из нетканной вискозы.

1.6. Помещают чашки в ростовые камеры, можно использовать различные температурные режимы, особенно если цель выделить термофильные или холодоустойчивые штаммы.

1.7. Наблюдают за появлением колоний в течение 7-21 суток.

1.8. Когда колонии будут хорошо заметны, их выкалывают с помощью стерильных зубочисток, выбирая отдельно растущие, и пересаживают в свежие чашки.

1.9. Полученные из колоний культуры микроскопируют и отбирают наиболее чистые и интересные для повторного этапа.

- 1.10. Повторяют для каждой выбранной культуры этапы 1.1-1.9.
- 1.11. Штамм, полученный из отдельной колонии, после 2-3 циклов метода разведений с высокой вероятностью будет представлять собой потомство одной клетки.
- 1.12. Для данной процедуры можно также использовать использовать 96-луночные планшеты.
- 1.13. Иногда такой способ позволяет сразу получить аксеничную культуру, но чаще этого не происходит, так как плотность бактериальных колоний всегда намного выше.
- 1.14. Альгологическая чистота подтверждается микроскопированием, однородностью колоний, полученных при использовании метода разведений или при посеве штрихом, молекулярно-генетическими данными.

2. Посев штрихом:

- 2.1. Более простой вариант предыдущего метода, подходит если известно, что накопительной культуре мало разных видов водорослей или нужно выделить массовый вид.
- 2.2. Небольшое количество биомассы микроводорослей наносится на поверхность агара согласно схеме, приведенной на рисунке К1. Петлю прожигают после каждых 6 штрихов или, если используют одноразовые петли, меняют на новую.

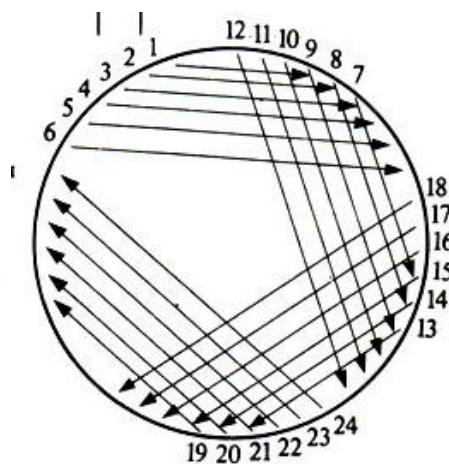


Рисунок 1 Посев штрихом.

- 2.3. Чашки переворачивают и заклеивают специальным пластырем из нетканной вискозы.
- 2.4. Помещают чашки в ростовые камеры, можно использовать различные температурные режимы, особенно если цель выделить термофильные или холодоустойчивые штаммы.
- 2.5. Наблюдают за появлением колоний в течение 7-21 суток.

- 2.6. Когда отдельные колонии в конце штриха будут хорошо заметны, их выкалывают с помощью стерильных зубочисток и пересаживают в свежие чашки.
- 2.7. Полученные из колоний культуры микроскопируют и отбирают наиболее чистые и интересные для повторного этапа.
- 2.8. Повторяют разделы 2.1-2.7 или используют метод разведений, описанный в разделе 1.
- 2.9. Альгологическая чистота подтверждается микроскопированием, однородностью колоний, полученных при использовании метода разведений или при посеве штрихом, молекулярно-генетическими данными

**Стандартная операционная процедура по проверке чистоты штаммов
цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН**

Составлено: к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол выделения альгологически чистых штаммов цианобактерий и микроводорослей из накопительных культур

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Бактерицидный проточный рециркулятор

Подставка для рециркулятора

Бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-Ламинар-С"-1,2

Горелка Феникс II эко газовая с ножной педалью в комплекте с адаптером для газ-картриджа

Компьютер в сборе

Плитка нагревательная HG-3001 К

Материалы, реактивы:

Петли микробиологические одноразовые

Агар бактериологический Difco

Глюкоза

Казеиновый гидролизат

Чашки Петри пластиковые, стерильные диаметр 90 мм

Спирт 95%

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Картридж газа С206, 160 мин горения, 190 г бутана

Бутыль стеклянная на 500 мл

Исполнители:

инженер

младший научный сотрудник

научный сотрудник

старший научный сотрудник

1. Проверка микроскопированием.

Проводится по соответствующим разделам СОП по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН и СОП по таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН. Клетки в культуре должны соответствовать описанию для данного штамма, других организмов не должно наблюдаться.

2. Проверка посевом методом истощающего штриха.

Проводится согласно описанию раздела 2 СОП по выделению альгологически чистых культур цианобактерий и микроводорослей из накопительных культур. Колонии должны быть однородны по цвету, форме и размеру (не всегда), бактериальных колоний не должно быть. Если обнаружены неоднородные колонии, их отсаживают и изучают микроскопированием полученные из них культуры. Если штамм оказался смесью нескольких микроводорослей, из него получают альгологически чистую культуру как описано в СОП по выделению альгологически чистых культур цианобактерий и микроводорослей из накопительных культур.

3. Посев на тестовую среду.

3.1. В качестве тестовых сред используют те же среды, на которых выращивают проверяемые штаммы, к которым добавлена глюкоза до конечной концентрации 2% и казеиновая кислота до конечной концентрации 0,2%. Тестовые среды разливают по чашкам, чашки разлиновывают и подписывают и проверяемые культуры высаживают по подписанным секторам. Проверку с посевом на тестовую среду обычно совмещают с пересевом культур.

3.2. Тестовые чашки помещают в темное место и проверяют на наличие бактериальных и грибных колоний на 3, 7, 14 и 21 день. Результаты проверки заносят в Журнал пересевов.

3.3. При обнаружении грибной контаминации штамм немедленно помещается в карантин. Проверяется чистота этого штамма в пробирках с более ранней датой посева. Если контаминация обнаружена и там, штамм подвергают обработке фунгицидом, как описано в разделе 1.1. СОП получения аксеничных штаммов из альгологически чистых культур.

Стандартная процедура получения аксеничных штаммов из альгологически чистых культур

Составлено: к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол получения аксеничных штаммов из альгологически чистых культур

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Бактерицидный проточный рециркулятор

Подставка для рециркулятора

Бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-Ламинар-С"-1,2

Горелка Феникс II эко газовая с ножной педалью в комплекте с адаптером для газ-картриджа

Компьютер в сборе

Плитка нагревательная HG-3001 К

Камера для роста растений Panasonic MLR-352

Камера климатическая MLR-351

Шейкер GFL 3015

Материалы, реактивы:

Петли микробиологические одноразовые

Петля инокуляционная из сплава платины и иридия

Агар бактериологический Difco

Пробирка биологическая П-2-21-200

Колба коническая КН-1-50-14/23

Чашки Петри пластиковые, стерильные диаметр 90 мм.

Спирт 95%

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Картридж газа С206, 160 мин горения, 190 г бутана

Карбендазим

Ампицилин

Циклогесимид

Исполнители:

младший научный сотрудник

старший научный сотрудник

Аксеничными или чистыми называют культуры, в которых содержатся клетки только одного штамма и нет других организмов.

Для получения аксеничных культур используются те же методы, что и для получения альгологически чистых культур, только в данном случае добиваются изолирования не от колоний других водорослей, а от колоний бактерий и грибного мицелия. Обычно на этом этапе также применяют антибиотики и фунгициды.

Процесс подтверждения аксеничности полученной культуры описан в СОП по проверке чистоты штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН

Подробное описание различных методов выделения чистых культур цианобактерий и микроводорослей можно найти по следующим ссылкам:

Algal Culturing Techniques. Andersen, RA, (ed.) Academic Press, Boston, USA, 2005. – 578 p.

Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). – Кострома: Костромской печатный дом, 2014. – 215 с

Ниже дано описание наиболее универсальных методов, используемых в коллекции IPPAS

1. Очистка с помощью антибиотиков.

- 1.1. Использование фунгицидов. К фунгицидам относятся циклогексемид, амфотерицин В, карбендазим. Наиболее эффективным показал себя карбендазим (Kan and Pan, 2010) в концентрации 40 мкг/л среды. Карбендазим ингибирует митоз в клетках грибов, животных и высших растений, так как он связывается с макромолекулами тубулина, образующие микротрубочки в нитях веретена деления. Таким образом, карбендазим наиболее эффективен для очистки от грибной контаминации прокариотических штаммов цианобактерий, не имеющих тубулина. В случае с эукариотическими микроводорослями карбендазим рекомендуется использовать в сочетании с антибиотиками ампициллином и цефотаксимом. Обычно при используемой концентрации ингибирование роста гриба намного более значительное, чем водоросли и за несколько пассажей через среду с карбендазимом от грибной контаминации удастся избавиться, не потеряв штамм микроводоросли.

- 1.2. Для уменьшения бактериального титра используют такие антибиотики, как ампициллин, цефотаксим, триметаприм, канамицин, спектиномицин. Спектр антибиотиков подбирают индивидуально для каждого штамма.
- 1.3. Для очистки цианобактерий от эукариотических микроводорослей можно использовать циклогексимид.
- 1.4. Необходимо соблюдать осторожность при использовании антибиотиков, так как они могут вызвать мутации в штамме, который чистят от контаминации. Кроме того возможно привыкание и возникновение устойчивых к используемым антибиотикам штаммов бактерий и грибов.

**Стандартная операционная процедура по таксономической идентификации
штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН**

Составлено: с.н.с.. Маркелова А.Г., к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол таксономической идентификации штаммов цианобактерий

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Пятиступенчатая система очистки воды методом обратного осмоса

Магистральный самопромывочный фильтр степени очистки 1 микрон Фибос

Система высокой очистки воды Simplicity

Весы РМ-200

рН-метр S-40K

Мешалка магнитная MMS-300

Амплификатор-ДНК

Вортекс Reax top Htidolph

Генератор льда Ice Flaker KF-45A

Микроскоп AxioImager D1

Насос вакуумный мембранный Milivac

Перемешиватель ротационный RM1

Спектрофотометр оптоволоконный NanoDrop 1000

Термостат (водяная баня)

Термостат (охлажд/нагр)

Трансиллюминатор ETX-20 C

Центрифуга 5415R с охлаждением

Центрифуга низкоскоростная Rotina 420R, Hettich

Система мини-электрофореза

Электронный микроскоп Libra 120

Компьютер в сборе

Материалы, реактивы:

Стекло предметное, Heinz Herenz

Стекло покровное

Фенол с Трис- HCl

Фенол-хлороформ для экстракции нуклеиновых кислот 77618

Спирт 95°

RNAase A

Параформальдегид

4% р-р тетроксид осмия 75632

Taq PCR Kit E5000S

Пробирки на 200 мкл для ПЦР

Пробирки с защелкой 2,0 мл Safe Lock

Микроцентрифужные пробирки, 1.5 мл

Наконечники 0.1-10 мкл, в башнях

Наконечники до 200 мкл, в башнях

Наконечники до 1000 мкл в башнях

Агароза

Дозатор на 200-1000 мкл

Дозатор на 2-20 мкл

Дозатор на 0,2-2 мкл

Набор для заключения в смолу Epon 45359-1EA-F

Сетки медные сетки медные, 300 ячеек (3030С-ХА)

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Исполнители:

инженер

старший научный сотрудник

Для таксономической идентификации цианобактерий используют полифазный подход, который включает в себя комплексный анализ морфологических, ультраструктурных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических характеристик штамма. Набор анализируемых характеристик подбирается индивидуально для каждого штамма на основании описаний в определителях и данных таксономических статей по соответствующим группам организмов. При описании морфологических и физиолого-биохимических признаков необходимо учитывать, что эти признаки значительно изменяются в зависимости от стадии роста культуры.

Таксономическая идентификация необходима для всех впервые выделенных в чистые культуры штаммов, помещаемых на хранение в Коллекцию, а также для тех штаммов из

фонда Коллекции, идентификация которых производилась только на основании морфологических признаков.

1. Анализ морфологических признаков для таксономической идентификации штаммов цианобактерий.

1.1. Макроморфологические признаки.

1.1.1. При росте на поверхности агаризованных сред к диагностическим макроморфологическим признакам относят характер роста на твердой среде (способность образовывать колонии или диффузный рост, подвижность), цвет штриха или колоний, способность образовывать макроколонии.

1.1.2. При росте в жидких средах к диагностическим макроморфологическим признакам относят характер роста в жидкой среде (образование гомогенной суспензии, образование осадка или налета на стенках колбы, рост с образованием матов), цвет суспензии.

1.1.3. Характерные макроморфологические признаки описывают и подтверждают фотоснимками.

1.2. Микроморфологические признаки.

1.2.1. Микроморфологические признаки изучают с помощью светового микроскопа. Для этого готовят временный препарат следующим образом: на предметное стекло капают каплю объемом 10 мкл с суспензией цианобактерий и накрывают покровным стеклом, не допуская образования пузырей. Суспензию цианобактерий получают, отбирая небольшой объем (100-1000 мкл) из жидкой культуры или ресуспендируя в среде или фосфатном буфере материал, собранный петлей с агаризованной среды. Морфологию клеток, колоний и филаментов изучают на 50х-1000х увеличении. При работе на увеличениях 630х и 1000х необходимо использовать иммерсионное масло. Исследуют микроморфологические признаки, характерные для изучаемого штамма и имеющие диагностическое значение:

- тип таллома (коккоидный, колониальный, нитчатый, нитчатый с ветвлением)
- размер клеток (делают измерения минимум 100 клеток)
- наличие дифференцированных клеток (гетероцист, ауксоспор, некридиев, гормогониев)

- наличие морфологических особенностей: форма клеток, прямая или спиральная нить, наличие слизистого чехла или растворимых экзополисахаридов;
- подвижность клеток или нитей;
- наличие и характер включений.

1.2.2. Характерные микроморфологические признаки описывают и подтверждают соответствующими фотоснимками.

1.3. Ультраструктурные признаки. Изучение ультраструктуры производят с использованием методов электронной микроскопии. Подготовка материала состоит из следующих этапов: фиксация материала; обезвоживание; подготовка к заключению в смолу; заключение в смолу; полимеризация.

1.3.1. *Фиксация.* Для обеспечения сохранения прижизненной структуры организмов и как можно большего количества белков применяется метод двойной фиксации – формалином на первом этапе и четырехокисью осмия на втором.

1.3.1.1. Цианобактерии, как правило, имеют очень плотную клеточную стенку и иногда еще полисахаридный слизистый чехол, что затрудняет проникновение фиксатора в клетку. Оптимальным для качественной фиксации является плотный осадок, который получается при центрифугировании суспензии. Используются микропробирки типа «эппендорф» объемом 2 мл с круглым дном и крышкой с замком; материал промывается средой, фосфатным буфером*, а затем, после второго центрифугирования, осадок (объемом до 3мм³) используется для дальнейших процедур.

0,1М фосфатный буфер с добавлением NaCl (Phosphate buffer saline, PBS), pH 7.4

Приготовить исходные растворы:

Раствор1: 2,76 г NaH₂PO₄ на 100 мл H₂O mQ

Раствор 2: 14,2 г Na₂HPO₄ на 500 мл H₂O mQ

Для приготовления 500 мл буфера PBS смешать 95 мл раствора 1 и 405 мл раствора 2; добавить 4,25 г NaCl (конечная концентрация 0,85%). pH полученного буфера должен быть 7,4 (при необходимости можно довести его добавлением NaOH).

1.3.1.2. Первый этап фиксации производят в 4% растворе параформальдегида в 0,1 М PBS (фосфатном буфере с добавлением 0,85% NaCl, pH 7,2-7,4). В отдельных случаях, например, при фиксации протопластов или клеток водорослей, не имеющих клеточной стенки, в фиксатор добавляется осмотик (например, глюкоза) в необходимом количестве. К промытому осадку добавляют 0,5-1 мл фиксатора. Время фиксации параформальдегидом может варьировать от нескольких часов при комнатной температуре до нескольких месяцев при 4 °С.

Приготовление 50 мл 4% раствора параформальдегида

Нагреть 50 мл 0,1 М буфера PBS (pH 7.4) до 70 °С на водяной бане.

Растворить 2 г параформальдегида в горячем буфере на водяной бане, периодически перемешивая смесь на вортексе.

Остудить раствор при комнатной температуре и профильтровать через фильтр (можно использовать фильтровальную бумагу или фильтр с диаметром пор 0,45 мкм).

Раствор может храниться при 4 °С в темноте в течение 7 дней.

1.3.1.3. Перед вторым этапом фиксации: раствор формалина удаляется и его замещает 1% раствор четырехокси осмия в таком же буфере, как и раствор параформальдегида. Оптимальные результаты получены при двукратной смене осмиевого фиксатора (объем 0,5-1 мл), каждая смена длится по 1 часу при 4 °С. Промывка образцов не производится ни на первом, ни на втором этапе фиксации. Удаление раствора из эппендорфа и внесение нового раствора производят пастеровскими пипетками, используя для каждого раствора свою пипетку.

Приготовление 1% раствора OsO₄ в расчете на 10 мл

Реактив	Количество
4% водный OsO ₄	2,5 мл
0,1М HCl	2 мл
0,1 М PBS	3 мл
H ₂ O mQ	2,5 мл

1.3.2. *Обезвоживание.* Перед заключением в смолу (эпон) материал обезвоживают.

Обезвоживание проводится без отмывания от фиксатора в градиенте спиртов, а затем в ацетоне.

1.3.2.1. Начинается проводка с 15% спирта – два раза по 15 минут, затем 25%, 50%, 70%, 96% и абсолютный спирт. Градиент может быть более дробный. До 96% спирта обезвоживание проводится при 4 °С, в холодильнике или во льду. Временные интервалы нахождения образцов в спирту – два раза по 25-30 минут. В 70% спирту образцы можно оставлять на ночь, если это необходимо.

1.3.2.2. После двукратной обработки материала абсолютным спиртом образцы помещаются в абсолютный ацетон. Интервал времени такой же – два раза по 30 минут. Желательно, чтобы осадок оставался плотным, если же он теряет плотность и материал диспергируется, можно использовать дополнительное центрифугирование при 4 °С и 16000 g в течение 3-5 минут.

1.3.3. *Пропитка образцов и заключение в эпон.* Перед тем, как образцы будут заключены в смолу с катализатором, они должны пройти длительную обработку в смолах, разведенных ацетоном (пропитывание).

1.3.3.1. Для приготовления исходной смолы смешиваются три компонента в определенных пропорциях: MNA:DDSA:EPON 812 = 1:2,6:2,7. Необходимо эту смесь хорошо перемешать, но так, чтобы не образовывались пузырьки. Если пузырьки появились, смолу можно на короткое время поместить в термостат на 45 °С.

1.3.3.2. Образцы выдерживаются в серии разведений смолы с ацетоном.

1:5 – 1 час

1:3 – 1 час

1:1 – 1 час, можно оставить на ночь

3:1 – 4 часа

Смола в нужном разведении готовится перед употреблением в том объеме, который необходим для заливки образцов (примерно 0,5-1 мл на один образец).

1.3.3.3. Затем образцы помещаются в исходную смолу, без добавления ацетона и оставляются для пропитки на ночь.

1.3.3.4. Перед заключением материала в капсулы готовится свежая смола с добавлением катализатора (1,6-1,7% по объему) из расчета 1,5 мл на образец. Рекомендуется на 1-2 часа поместить материал (пока в пробирках) в новую смолу, с катализатором.

1.3.3.5. Подготавливаются желатиновые капсулы: их выставляют в 96-луночную плашку, предварительно пронумерованную несмываемым маркером. На каждый образец готовят 2-3 капсулы, и 2 запасных. С капсул снимают крышечки и помещают в лунки (сначала крышечку, а в нее саму капсулу). Затем заполняют капсулы смолой примерно на треть.

1.3.3.6. В подготовленные капсулы с помощью стального шпателя-ложки переносятся кусочки материала так, чтобы они находились ближе к доньшку капсулы.

1.3.3.7. После окончания этой процедуры в капсулы добавляется смола до полного объема.

1.3.3.8. Для полимеризации плашку с капсулами помещают в эксикатор с обезвоживающим веществом, это может быть концентрированная серная кислота или пятиокись фосфора.

1.3.3.9. Закрытый эксикатор оставляют при комнатной температуре примерно на 12 часов.

1.3.3.10. Затем эксикатор с капсулами переносится в термостат и температура изменяется следующим образом:

37 °С – 1 сутки

45 °С – 1 сутки

56 °С - до полного затвердевания смолы.

Степень затвердевания проверяют с помощью препаровальной иглы.

1.3.3.11. Готовые капсулы вынимаются из плашки и складываются в эппендорфы, на которых указывают номер образца и дату заключения в смолу. Через 10-14 дней можно приступать к получению ультратонких срезов для изучения в электронном микроскопе.

1.3.4. Приготовление ультратонких срезов осуществляется инженером в кабинете электронной микроскопии на ультрамикротоме стеклянным или алмазным ножом. Срезы помещаются на медные сеточки, предварительно покрытые формваром.

1.3.5. Полученные ультратонкие срезы контрастируют в два этапа: сначала обрабатывают срезы раствором уранилацетата, затем цитратом свинца по Рейнольдсу. При совместном использовании уранилацетата и свинца достигается максимальная контрастность препарата.

1.3.5.1. Насыщенный раствор уранилацетата в 50% спирте готовится перед употреблением. Сеточки со срезами размещаются на капле контрастирующего раствора объемом 100 мкл во влажной атмосфере с парами NaOH для предотвращения реакции CO₂ с реагентом. Окраска происходит на тефлоновом диске, помещенном в стеклянную чашку Петри, с влажной подложкой из фильтровальной бумаги и несколькими гранулами NaOH. Сеточки выдерживают на каплях краски в течение 45-60 мин.

1.3.5.2. Перед вторым этапом важно хорошо отмыть сеточки от реактива. Промывка ведется в 0.02 М NaOH (маканием сеточки в раствор 10 раз) и трех сменах очищенной (mQ) воды, предварительно прокипяченной с целью удаления растворенного углекислого газа (маканием в течение 1 мин в каждой смене воды).

1.3.5.3. Цитрат свинца по Рейнольдсу готовится по стандартной прописи.

Приготовление цитрата свинца по Рейнольдсу:

- Растворить 1,33 г Pb(NO₃)₂ и 1,76 g Na₃(C₆H₅O₇)·2H₂O в 30 мл воды mQ. Оставить перемешивать на орбитальном шейкере в течение 30 мин. Раствор должен стать молочно-белым.

- Добавить 8 мл 1 М NaOH: раствор должен стать прозрачным. Довести объем до 50 мл водой mQ. pH должен быть около 12.

Для лучшей сохранности раствора он разливается по микропробиркам (1.5 -2 мл) и хранится в замороженном виде при -20 °С. Раствор размораживается перед

использованием, центрифугируется при комнатной температуре на 14000 g в течение 3 минут для избавления от осадка.

Окраска так же, как и на первом этапе, проводится на каплях реактива объемом 100 мкл во влажной камере на тефлоновом диске. Длительность окрашивания – 7-15 минут.

1.3.5.4. После второго этапа необходима тщательная промывка, как описано в разделе 1.3.5.2.

1.3.5.5. Промытые сеточки выкладывают на чистую фильтровальную бумагу и дают им полностью высохнуть. Высохшие сеточки убирают в контейнер.

1.3.6. Срезы просматривают на электронном микроскопе, обычно при 4000x-20000x увеличении. Характерные ультраструктурные признаки описывают и подтверждают соответствующими фотоснимками.

2. Анализ физиолого-биохимических признаков для таксономической идентификации штаммов цианобактерий.

2.1. Пигментный состав.

2.1.1. Определить состав основных пигментов цианобактерий в первом приближении можно по спектру поглощения суспензии цианобактерий (подходит только для штаммов, образующих гомогенную суспензию). Спектр поглощения измеряют на спектрофотометре Cary 300 UV-Vis (Agilent) в диапазоне длин волн от 350 до 750 нм. О присутствии определенного класса пигментов судят по наличию пиков с соответствующими максимумами:

Пигменты	Максимум(ы) поглощения
хлорофилл <i>a</i>	около 670-680 нм, 440 нм
хлорофилл <i>b</i>	653 нм, 472 нм
хлорофилл <i>d</i>	около 720 нм, 460 нм
фикоцианин	около 620 нм
фикоэритрин	495 и 546/566 нм
каротиноиды	420 – 480 нм

2.1.2. Вывод о наличии или отсутствии других форм хлорофилла *b,c,d,f* можно сделать, измерив спектр метанольного экстракта пигментов и применив соответствующие формулы, учитывающие коэффициенты поглощения разных форм хлорофилла. Также можно проанализировать экстракт пигментов (предпочтительно хлороформный) методом ВЭЖХ. Состав каротиноидов можно определить только методом ВЭЖХ. Фикоэритрин может не иметь

выраженного пика поглощения в суспензии клеток, если его содержание значительно ниже фикоцианина. Для его детекции в этом случае анализируют водный экстракт пигментов. Количественное определение пигментов возможно только в экстрактах пигментов. Получение экстрактов пигментов из цианобактерий описано в СОП характеристики биотехнологического потенциала штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН в разделе 2.

Необходимо учитывать, что пигментный состав зависит от спектрального состава света, например для накопления хлорофилла *f* в достаточном для детекции количестве необходим дальний красный цвет, для накопления фикоэритрина – зеленый.

2.2. Жирнокислотный состав общих липидов. Подготовка проб для анализа жирнокислотного состава общих липидов описана в СОП характеристики биотехнологического потенциала штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН в разделе 5.

3. Молекулярно-генетический анализ для таксономической идентификации штаммов цианобактерий.

3.1. Выделение ДНК из клеток цианобактерий. Для таксономической идентификации оптимально использовать аксеничные штаммы цианобактерий (получение аксеничных культур описано в СОП по получению аксеничных штаммов из альгологически чистых культур).

ДНК выделяют фенол-хлороформным методом. Подробное описание протокола можно найти по ссылкам:

<http://www.bio-protocol.org/e1428>

http://molbiol.ru/protocol/24_01.html

3.2. Для молекулярно-генетической идентификации цианобактерий используют последовательность гена 16S рРНК и вторичную структуру 16S-23S ITS региона.

3.2.1. Амплификация фрагментов гена 16S рРНК.

Для аксеничных культур используют универсальные прокариотические праймеры 16s rDNA

8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

EB-1530R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3',

которые дают у цианобактерий фрагмент длиной около 1400 п.н., равный практически целому гену 16S рРНК.

Для контаминированных другими бактериями культур используют специфические цианобактериальные праймеры

CYA106F 5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3'

CYA781R 5'-GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT-3',

которые дают фрагмент длиной около 700 п.н.

3.2.2. Для амплификации 16S-23S ITS региона используют праймеры

ITS_F 5'-TGTACACACCGCCCGTC-3'

ITS_R 5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3',

которые могут дать несколько продуктов ПЦР разной длины, в случае, если у данного штамма несколько оперонов, кодирующих рибосомальную РНК (обычно длина продукта около 700 п.н.).

3.2.3. Полученные продукты ПЦР разделяют электрофорезом в агарозном геле, вырезают участки геля, содержащие продукт ПЦР и выделяют ДНК из геля. Выделенную ДНК отправляют на секвенирование по Сэнгеру.

3.2.4. Филогенетический анализ на основе последовательности 16s рРНК

3.2.4.1. Полученную в результате секвенирования последовательность гена 16S рРНК сравнивают с известными цианобактериальными последовательностями в базе данных Genbank NCBI с помощью алгоритма BLASTn.

3.2.4.2. Полученную последовательность выравнивают с выбранными гомологичными последовательностями, используя ClustalW в программе MEGA7. Затем проводят филогенетический анализ с использованием метода максимального правдоподобия основанного на модели Тамура-Неи в MEGA7 с выборкой N=1000 для бутстрап-анализа и остальными параметрами, установленными по умолчанию. На основе анализа делают вывод о таксономической принадлежности штамма. Обычно данный анализ позволяет идентифицировать штамм на уровне рода.

3.2.4.3. Для полученных последовательностей ITS строят модель вторичной структуры с помощью онлайн программы Sfold 2.2 и сравнивают ее с вторичной структурой ITS родственных штаммов. Этот анализ дает возможность определить штамм до видового уровня.

**Стандартная операционная процедура по таксономической идентификации
штаммов эукариотических микроводорослей коллекции IPPAS ИФР РАН**

Составлено: с.н.с.. Маркелова А.Г., к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол таксономической идентификации эукариотических штаммов микроводорослей

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Пятиступенчатая система очистки воды методом обратного осмоса

Магистральный самопромывочный фильтр степени очистки 1 микрон Фибос

Система высокой очистки воды Simplicity

Весы РМ-200

рН-метр S-40K

Мешалка магнитная MMS-300

Амплификатор-ДНК

Вортекс Reax top Htidolph

Генератор льда Ice Flaker KF-45A

Микроскоп AxioImager D1

Насос вакуумный мембранный Milivac

Перемешиватель ротационный RM1

Спектрофотометр оптоволоконный NanoDrop 1000

Термостат (водяная баня)

Термостат (охлажд/нагр)

Трансиллюминатор ETX-20 C

Центрифуга 5415R с охлаждением

Центрифуга низкоскоростная Rotina 420R, Hettich

Система мини-электрофореза

Электронный микроскоп Libra 120

Компьютер в сборе

Материалы, реактивы:

Стекло предметное, Heinz Herenz

Стекло покровное

Набор для выделения ДНК из растений GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma G2N10-1KT)

Жидкий азот

Спирт 95°

RNAase A

Параформальдегид

4% р-р тетроксид осмия 75632

Taq PCR Kit E5000S

Пробирки на 200 мкл для ПЦР

Пробирки с защелкой 2,0 мл Safe Lock

Микроцентрифужные пробирки, 1.5 мл

Наконечники 0.1-10 мкл, в башнях

Наконечники до 200 мкл, в башнях

Наконечники до 1000 мкл в башнях

Агароза

Дозатор на 200-1000 мкл

Дозатор на 2-20 мкл

Дозатор на 0,2-2 мкл

Набор для заключения в смолу Epon 45359-1EA-F

Сетки медные сетки медные, 300 ячеек (3030C-XA)

Халат лабораторный

Перчатки латексные

Исполнители:

инженер

старший научный сотрудник

Для таксономической идентификации эукариотических микроводорослей используют полифазный подход, который включает в себя комплексный анализ морфологических, ультраструктурных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических характеристик штамма. Набор анализируемых характеристик подбирается индивидуально для каждого штамма на основании описаний в определителях и данных таксономических статей по соответствующим группам организмов. При описании морфологических и физиолого-биохимических признаков необходимо учитывать, что эти признаки значительно изменяются в зависимости от стадии роста культуры.

Таксономическая идентификация необходима для всех впервые выделенных в чистые культуры штаммов, помещаемых на хранение в Коллекцию, а также для тех штаммов из фонда Коллекции, идентификация которых производилась только на основании морфологических признаков.

1. Анализ морфологических признаков для таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей.

1.1. Макроморфологические признаки эукариотических штаммов анализируются как описано в разделе 1.1 СОП по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН.

1.2. Микроморфологические признаки изучают с помощью светового микроскопа также, как описано в разделе 1.2 СОП по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН. Исследуют микроморфологические признаки, характерные для изучаемого штамма и имеющие диагностическое значение:

- тип таллома (коккоидный, монадный, пальмелоидный, ценнобиальный, колониальный, нитчатый, нитчатый с ветвлением, разнонитчатый)
- размер клеток (делают измерения минимум 100 клеток)
- наличие морфологических особенностей клеток: форма клеток, выросты, панцирь, наличие пиреноида, форма и цвет хроматофора, наличие и характер включений, клеточная стенка, наличие экзополимерных соединений.
- способ размножения (образование автоспор, зооспор, их количество). Для этого иногда необходимо поместить культуру в специальные условия, описанные в соответствующей литературе.

1.3. Ультраструктурные признаки изучают с использованием методов электронной микроскопии как описано в разделе 1.3 СОП по таксономической идентификации штаммов цианобактерий коллекции IPPAS ИФР РАН.

2. Анализ физиолого-биохимических признаков для таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей.

2.1. Пигментный состав.

2.1.1. Определить состав основных пигментов эукариотических микроводорослей в первом приближении можно по спектру поглощения суспензии клеток (подходит только для штаммов, образующих гомогенную суспензию). Спектр поглощения измеряют на спектрофотометре Cary 300 UV-Vis (Agilent) в диапазоне длин волн от 350 до 750 нм. О присутствии определенного класса пигментов судят по наличию пиков с соответствующими максимумами:

Пигменты	Максимум(ы) поглощения
хлорофилл <i>a</i>	около 670-680 нм, 440 нм
хлорофилл <i>b</i>	653 нм, 472 нм
хлорофилл <i>c</i>	
фикоцианин	около 620 нм
фикоэритрин	495 и 546/566 нм
каротиноиды	420 – 570 нм

2.1.2. Вывод о наличии или отсутствии форм хлорофилла *b* и *c* с уверенностью можно сделать, только измерив спектр метанольного экстракта пигментов и применив соответствующие формулы, учитывающие коэффициенты поглощения разных форм хлорофилла. Также можно проанализировать экстракт пигментов (предпочтительно хлороформный) методом ВЭЖХ. Состав каротиноидов можно определить только методом ВЭЖХ. Количественное определение пигментов возможно только в экстрактах пигментов. Получение экстрактов пигментов из микроводорослей описано в СОП характеристики биотехнологического потенциала штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН в разделе 2.

2.2. Жирнокислотный состав общих липидов. Подготовка проб для анализа жирнокислотного состава общих липидов описана в СОП характеристики биотехнологического потенциала штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН в разделе 5.

3. Молекулярно-генетический анализ для таксономической идентификации штаммов эукариотических микроводорослей.

3.1. Выделение ДНК из клеток микроводорослей. Для таксономической идентификации оптимально использовать аксеничные штаммы микроводорослей (получение аксеничных культур описано в СОП по получению аксеничных штаммов из альгологически чистых культур).

ДНК выделяют из клеток микроводорослей, растертых в жидком азоте, с помощью набора для выделения ДНК из растений GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma G2N10-1KT) согласно инструкции производителя.

3.2. Для молекулярно-генетической идентификации микроводорослей используют различные последовательности. Универсальными для всех таксонов являются последовательности ядерного гена, кодирующего 18S рРНК, ITS1-5.8S-ITS2 регион, хлоропластные гены, кодирующие хлоропластную рибосомную 16S рРНК и большую субъединицу РБФК (*rbcL*). Для идентификации зеленых

микроводорослей используют также последовательность гена фактора элонгации белкового синтеза хлоропластов *tufA*.

3.2.1. Амплификация фрагментов гена 18S рРНК.

Если таксономическое положение штамма неизвестно, используют универсальные праймеры

18s_F 5'-GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA-3'

18s_R 5'-AAGGGCAGGGACGTAATCAACG-3'

которые дают продукт длиной около 700 п.н. (при наличии интронов длина продукта может достигать 1300 и более п.н.).

Для получения более полной последовательности гена 18s рРНК используют следующие праймеры в различных комбинациях:

SSU1_F 5'-TGGTTGATCCTGCCAGTAG-3'

Euk-A_F 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'

SSU2_R 5'-TGATCCTTCCGCAGGTTTAC-3'

18L_R 5'-CACCTACGGAAACCTTGTTACGACTT-3'

3.2.2. Для амплификации ITS1-5.8S-ITS2 региона используют следующие праймеры в различных комбинациях:

ITS5_F 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

ITS4_R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS_R 5'-ATCCTGCAATTCACACCAAGTATCG-3'

ITS055_R 5'-CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3'

3.2.3. Для амплификации частичной последовательности *rbcL* гена используют праймеры

RbcLs_F 5'-AACCTTTCATGCGTTGGAGAGA-3'

RbcLs_R 5'-CCTGCATGAATACCACCAGAAGC-3'

которые дают короткий продукт длиной около 700 п.н. и используется для предварительной идентификации или для проверки аутентичности

Для более полного покрытия последовательности гена *rbcL* используют следующие праймеры:

RbcL_F 5'-TGCTGGATTTAAAGCAGGTG-3'

RbcL1394_R 5'-GAGTATCGATAGTTTTCGAATTC-3'

RbcL1338_R 5'-GСТААТТССGGGCTCCАТТТGC-3'

3.2.4. Для амплификации частичной последовательности гена *tufA* используют следующие праймеры:

tufA_F 5'-TGAAACAGAAAWCGTCATTATGC-3'

tufA_R 5'-CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC-3'

tufA50_F 5'-TGGATGGTGCTATTTYTAGTTG-3'

tufA870 R 5'-ATAGTGTCRCCTGGCATAGC-3'

3.2.5. Полученные продукты ПЦР разделяют электрофорезом в агарозном геле, вырезают участки геля, содержащие продукт ПЦР и выделяют ДНК из геля. Выделенную ДНК отправляют на секвенирование по Сэнгеру.

3.2.6. Филогенетический анализ на основе полученных последовательностей

3.2.6.1. Для полученных в результате секвенирования последовательностей ищут в базе данных Genbank NCBI с помощью алгоритмов BLASTn и BLASTp ближайшие гомологичные последовательности.

3.2.6.2. Найденные гомологичные последовательности выравнивают, используя алгоритм ClustalW в программе MEGA7. Затем проводят филогенетический анализ с использованием метода максимального правдоподобия основанного на модели Тамура-Неи в MEGA7 с выборкой N=1000 для бутстрап-анализа и остальными параметрами, установленными по умолчанию. На основе анализа делают вывод о таксономической принадлежности штамма.

3.2.6.3. Для полученных последовательностей ITS строят модель вторичной структуры с помощью онлайн программы Sfold 2.2 и сравнивают ее с вторичной структурой ITS родственных штаммов.

**Стандартная операционная процедура характеристики биотехнологического
потенциала штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН**

Составлено: к.б.н., с.н.с. Синетова М.А.

Содержание и назначение: Протокол биохимического исследования штаммов микроводорослей и цианобактерий для характеристики их биотехнологического потенциала

Местонахождение: ИФР РАН

Пересмотр через: 1 год

Версия: 1

Дата составления: 19 сентября 2017 г.

Оборудование и реактивы:

Пятиступенчатая система очистки воды методом обратного осмоса

Магистральный самопромывочный фильтр степени очистки 1 микрон Фибос

Система высокой очистки воды Simplicity

Весы PM-200

pH-метр S-40K

Мешалка магнитная MMS-300

Вортекс Reax top Htidolph

Генератор льда Ice Flaker KF-45A

Весы аналитические 770-12

Насос вакуумный мембранный Milivac

Перемешиватель ротационный RM1

Вибрационная мельница MM 400

Термостат (водяная баня)

Термостат (охлажд/нагр)

Газожидкостный хроматограф с масс-спектрометрическим детектором Agilent 7890A/5975C

Центрифуга 5415R с охлаждением

Центрифуга низкоскоростная Rotina 420R, Hettich

Спектрофотометр двухлучевой Cary 300

Шкаф сухожаровой FD-53

Компьютер в сборе

Материалы, реактивы:

Серная кислота 141058.1611

Фенол с Трис- HCl P4557

Метанол
Спирт 95%
Изопропанол
Пробирки 50 мл, PlugSeal, стерильные
Пробирка типа Falcon 15 мл в упаковке
Крышки резьбовые с ребрами из TPE (SSI-2005)
Пробирки резьбовые конические, 2 мл (SSI-2330),
Пробирки с защелкой 2,0 мл Safe Lock
Микроцентрифужные пробирки, 1.5 мл
Наконечники до 5 мл
Наконечники до 200 мкл, в башнях
Наконечники до 1000 мкл в башнях
Дозатор на 1- 5 мл
Дозатор на 200-1000 мкл
Дозатор на 2-20 мкл
Кюветы пластиковые Semi-micro, ОП 10 мм, 390-900 нм, 1500 мкл
Кювета кварцевая микро, ОП 10 мм, 190-2000, 700 мкл
Халат лабораторный
Перчатки латексные
Стеклянные бусины, G1277-100G
Набор BCA1, Sigma-Aldrich

Исполнители:

инженер

старший научный сотрудник

1. Измерение скорости роста.

1.1. Скорость роста оценивается по изменению оптической плотности суспензии при 750 нм и по накоплению биомассы.

1.1.1. Для измерения оптической плотности отбирают пробы объемом 1 мл из интенсивно растущей культуры каждые сутки в течение 10 дней. Оптическую плотность (ОП) измеряют в пластиковых кюветах на спектрофотометре при длине волны 750 нм. Значение ОП не должно превышать 0,5 о.е., если плотность культуры выше, ее разбавляют средой и при построении кривых роста учитывают коэффициент разведения.

1.1.2. Для оценки накопления биомассы измеряют сухую массу проб объемом 2-50

мл. Для этого пробы осаждают центрифугированием, промывают дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу 24 ч при 80°C в предварительно взвешенных емкостях. Через сутки емкости взвешивают повторно и вычисляют сухую массу проб, вычитая вес тары.

1.1.3. Относительная скорость роста, μ , оценивается по изменению оптической плотности культуры или по сухой массе (сутки⁻¹)

$$\mu = \frac{N_2 - N_1}{N \times (t_2 - t_1)} = \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}{t_2 - t_1}$$

где N_1 и N_2 - оптическая плотность культуры при 750 нм или сухая масса 1 мл культуры измеренная во время 1 (t_1) и время 2 (t_2) соответственно.

1.1.4. По относительной скорости также рассчитывалось время удвоения биомассы $T_{удв.}$:

$$T_{удв.} = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

1.1.5. Рассчитывают максимальную относительную скорость роста в экспоненциальной фазе роста при низких плотностях культуры, а также относительную скорость роста и среднюю скорость накопления биомассы на поздних стадиях роста при больших плотностях культуры.

2. Анализ пигментного состава.

В состав пигментов микроводорослей и цианобактерий входят хлорофиллы, каротиноиды и фикобилипротеины. Содержание хлорофилла и каротиноидов анализируется в органических растворителях, в основном в метаноле и хлороформе. Содержание водорастворимых фикобилипротеинов анализируется в водных экстрактах разрушенных клеток.

2.1. Получение метанольного экстракта из клеток цианобактерий.

2.1.1. Пробы (в трех повторностях) объемом 0,5-2 мл осаждают центрифугированием, тщательно отбирают с помощью пипетки супернатант. Такие пробы можно хранить до измерения при -20 °С.

2.1.2. Для экстракции пигментов к осадку добавляют 1 мл охлажденного до 4°C метанола. Тщательно перемешивают пипетированием.

2.1.3. Пробы оставляют на 20 мин при 4 °С до полной экстракции пигментов.

2.1.4. Осаждают клеточный дебрис центрифугированием при 4 °С. Осадок должен быть голубым или розовым.

2.1.5. Измеряют спектр поглощения экстракта на спектрофотометре в диапазоне волн 350-750 нм.

2.1.6. Рассчитывают содержание пигментов по формулам

$Chl_a = 12.94 (A_{665} - A_{720})$ [mg/L] (Ritchie, 2006).

$Carotenoids = \{1000(A_{470} - A_{720}) - 2.86Chl_a\}/221$ [mg/L] (Wellburn, 1994).

Большинство цианобактерий имеют только хлорофилл а, но если исследуемый штамм содержит другие формы хлорофилла, используют другие расчетные формулы.

2.2. Получение метанольного экстракта из клеток эукариотических микроводорослей.

2.2.1. Пробы (в трех повторностях) объемом 0,5-2 мл осаждают центрифугированием, тщательно отбирают с помощью пипетки супернатант. Такие пробы можно хранить до измерения при -20 °С.

2.2.2. Для экстракции пигментов к осадку добавляют 1 мл охлажденного до 4°С метанола. Тщательно перемешивают пипетированием.

2.2.3. Переносят полученную суспензию в эппендорфы с завинчивающимися крышками, в которых предварительно насыпано 0,5 мл стеклянных бус. Тщательно завинчивают крышки эппендорфов.

2.2.4. Эппендорфы помещают в предварительно охлажденный при -20 °С тefлоновый держатель и разрушают клетки на вибрационной мельнице Retsch MM400 при частоте ударов 30 Гц в течение 5 мин.

2.2.5. Пробы оставляют на 20 мин при 4 °С до полной экстракции пигментов.

2.2.6. Осаждают клеточный дебрис центрифугированием при 4 °С. Осадок должен быть белого или серого цвета. Если осадок еще зеленый, повторяют пункт 2.2.3.

2.2.7. Отбирают пигментный экстракт, не задевая стеклянные бусы и клеточный дебрис и измеряют спектр поглощения экстракта на спектрофотометре в диапазоне волн 350-750 нм.

2.2.8. Рассчитывают содержание пигментов по формулам

$Chl_a = -8.0962(A_{652} - A_{720}) + 16.52(A_{665} - A_{720})$ (Ritchie, 2006).

$Chl_b = 27.44(A_{652} - A_{720}) - 12.17(A_{665} - A_{720})$ (Ritchie, 2006).

$Carotenoids = \{1000(A_{470} - A_{720}) - 2.86Chl_a - 129.2Chl_b\}/221$ (Wellburn, 1994).

2.3. Получение водного экстракта клеток цианобактерий и микроводорослей, содержащих фикобилипротеины.

- 2.3.1. Пробы (в трех повторностях) объемом 2-5 мл осаждают центрифугированием, тщательно отбирают с помощью пипетки супернатант. Такие пробы можно хранить до измерения при -20 °С.
- 2.3.2. Для экстракции водорастворимых пигментов к осадку добавляют 1 мл фосфатного буфера. Тщательно перемешивают пипетированием.
- 2.3.3. Переносят полученную суспензию в эппендорфы с завинчивающимися крышками, в которых предварительно насыпано 0,5 мл стеклянных бус. Тщательно завинчивают крышки эппендорфов.
- 2.3.4. Эппендорфы помещают в тефлоновый держатель и разрушают клетки на вибрационной мельнице Retsch MM400 при частоте ударов 30 Гц в течение 5 мин.
- 2.3.5. Замораживают клетки при -20 °С.
- 2.3.6. Размораживают при комнатной температуре, периодически вортируя.
- 2.3.7. Повторяют пункты 2.2.3-2.2.5 не менее трех раз.
- 2.3.8. Осаждают клеточный дебрис центрифугированием при 4 °С.
- 2.3.9. Отбирают пигментный экстракт, не задевая стеклянные бусы и клеточный дебрис и измеряют спектр поглощения экстракта на спектрофотометре в диапазоне волн 350-750 нм.
- 2.3.10. Рассчитывают содержание пигментов по формулам (Bennet and Bogorad, 1973)

$$PC = ((A_{615} - A_{720}) - 0.474(A_{652} - A_{720}))/5.34$$

$$APC = ((A_{652} - A_{720}) - 0.208(A_{615} - A_{720}))/5.09$$

$$PE = ((A_{562} - A_{720}) - 2.41 PC - 0.849 APC)/9.62$$

Где PC – фикоцианин, APC – аллофикоцианин, PE – фикоэритрин.

3. Определение содержания белка в клетках микроводорослей и цианобактерий.

- 3.1. Пробы (в трех повторностях) объемом 5 мл осаждают центрифугированием при комнатной температуре и 4000 g в течение 5 минут, надосадочную жидкость сливают и переносят осадок в эппендорф.
- 3.2. Повторно осаждают центрифугированием при комнатной температуре и 16000 g в течение 5 минут. Тщательно удаляют надосадочную жидкость. Полученный осадок можно хранить при -20 °С до измерения.
- 3.3. Перед экстракцией белка клетки обесцвечивают метанолом. Для этого к осадку добавляли 0,8 мл 100% метанола и ресуспендируют.

- 3.4. Переносят полученную суспензию в эппендорфы с завинчивающимися крышками, в которых предварительно насыпано 0,5 мл стеклянных бус. Тщательно завинчивают крышки эппендорфов.
- 3.5. Эппендорфы помещают в тefлоновый держатель и разрушают клетки на вибрационной мельнице Retsch MM400 при частоте ударов 30 Гц в течение 5 мин.
- 3.6. После разрушения клеток образцы центрифугируют на максимальной скорости в течение 10 минут при комнатной температуре.
- 3.7. Метанол удаляют микропипеткой, экстракцию пигментов метанолом повторяют 2-3 раза до обесцвечивания осадка.
- 3.8. Обесцвеченный осадок подсушивают в термостате при 65°C до полного испарения метанола.
- 3.9. К высушенному осадку добавляют 1 мл экстракционного буфера (50 мМ Tris pH 6,8; 2% SDS).
- 3.10. Белок экстрагировали из дебриса 2 ч при 37 °С или 10 мин при 95 °С.
- 3.11. Клеточный дебрис осаждают центрифугированием при комнатной температуре и 16000 g в течение 10 минут.
- 3.12. Концентрацию белка определяют спектрофотометрически с бицинхониновым реагентом (BCA Protein Assay, Pierce) (по Smith et al., 1985).
 - 3.12.1. Для этого отбирают 25 мкл белкового экстракта и добавляют 500 мкл смеси бицинхониновой кислоты и CuSO_4 в соотношении 50:1 по объему в каждую пробирку.
 - 3.12.2. Раствор перемешивают вортексированием и инкубируют при 37°C в течение 30 мин, затем определяют оптическую плотность полученного раствора при 562 нм на спектрофотометре.
 - 3.12.3. Концентрацию белка рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по серии разведений бычьего сывороточного альбумина в концентрациях 0.12, 0.24, 0.48, 0.96, 1.2 мг/мл.

4. Определение содержания углеводов в клетках микроводорослей и цианобактерий.

- 4.1. Пробы (в трех повторностях) объемом 0,5-2 мл осаждают центрифугированием, тщательно отбирают с помощью пипетки супернатант. Такие пробы можно хранить до измерения при -20 °С.
- 4.2. К осадку добавляют 400 мкл 30% (в/о) КОН и инкубируют 90 мин при 95°C.
- 4.3. Затем добавляют 1,2 мл охлажденного до -20 °С этанола и оставляют образцы на ночь при -20 °С.

- 4.4. Выпавшие в осадок углеводы собирают центрифугированием при 16000 g в течение 60 мин при 4 °С.
- 4.5. Надосадочную жидкость отбирают с помощью вакуумного насоса, полученный осадок подсушивали 15 мин при 60 °С.
- 4.6. Затем осадок гидролизуют до глюкозы в 80 мкл 2 М HCl 30 мин при 95 °С.
- 4.7. Полученный раствор нейтрализуют добавлением 80 мкл 2 М NaOH и 40 мкл 1М фосфатного буфера (рН 7), разбавляли 200 мкл дистиллированной воды.
- 4.8. Содержание углеводов определяют фенол-сернокислым методом (Dubois et al., 1956).
 - 4.8.1. Для этого к 100 мкл образца добавляют 100 мкл 5% (v/v) водного раствора фенола, тщательно перемешивают и добавляют 500 мкл концентрированной серной кислоты, затем снова перемешивают.
 - 4.8.2. Полученную смесь оставляют на 10 мин до окончания развития цветной реакции.
 - 4.8.3. Затем измеряют ее оптическую плотность при 490 нм на спектрофотометре.
 - 4.8.4. Концентрацию углеводов рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по серии разведений глюкозы в концентрациях 30, 60, 90 и 120 мкг/мл с использованием поправочного коэффициента 0,9.

5. Определение содержания общих липидов и их жирнокислотного состава в клетках микроводорослей и цианобактерий.

- 5.1. Пробы (в трех повторностях) объемом 15-50 мл осаждают центрифугированием 6 мин при ускорении 4000 g и температуре 22°С.
- 5.2. Сливают культуральную среду и промывают осадок 25 мл деионизированной воды.
- 5.3. Повторно центрифугируют, сливают супернатант и ресуспендируют осадок в 5-10 мл деионизированной воды.
- 5.4. Количественно переносят ресуспендированные клетки в 15 мл пробирку, центрифугируют при тех же условиях и аккуратно удаляют воду пипеткой.
- 5.5. Полученный осадок фиксируют в шестикратном объеме (5-9 мл) горячего (65 °С) изопропанола с добавлением 20 мг/л ионола.
- 5.6. Пробы инкубируют на водяной бане при 65°С в течение 10 минут.
- 5.7. Дают пробам остыть при комнатной температуре и хранят их до измерения при -20°С.
- 5.8. Определение жирнокислотного состава суммарных липидов производят в лаборатории липидного обмена ИФР РАН.

- 5.8.1. Для этого из зафиксированной биомассы микроводорослей выпаривают изопропанол, добавляют маргариновую кислоту в качестве внутреннего стандарта и омыляют 6% водно-спиртовой щелочью с последующим отделением неомыляемых компонентов от свободных ЖК.
- 5.8.2. Анализ полученной смеси метиловых эфиров ЖК, а также количественное содержание суммарных липидов в пересчёте на этерифицированные жирные кислоты, выполняют с помощью ГЖХ-МС на газожидкостном хроматографе Agilent 7890A с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975C