

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора ФГБНУ ВНИИСХМ
доктор биологических наук



Н.А. Проворов

2017 г.

Технологический паспорт ВКСМ ВНИИСХМ

Составитель:

Заведующая Ведомственной коллекцией полезных микроорганизмов
сельскохозяйственного назначения,
кандидат биологических наук

Сафронова В.И.

Санкт-Петербург-Пушкин
2017 г.

Данный Технологический паспорт составлен в результате верификации стандартных операционных процедур (СОП), используемых в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ). Технологический паспорт содержит:

- 1.1. полный набор ключевых СОП, обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда ВКСМ,
- 1.2. Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур ВКСМ ВНИИСХМ.

Технологический паспорт представляет оптимизированные протоколы СОП и является основанием для осуществления ВКСМ коллекционной деятельности.

Содержание:

1. СОП ВКСМ для поддержания единиц хранения:	
1.1. Криоконсервацию штаммов при -150°C	4
1.2. Хранение штаммов при -80°C на Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов	4
2. СОП ВКСМ для контроля качества единиц хранения:	
2.1. Стандартные микробиологические рассевы	5
2.2. Световая микроскопия с использованием микроскопа Axiolab	5
2.3. Секвенирование генов рибосомных РНК на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl	6
2.4. Поиск гомологичных последовательностей в базе данных GenBank	6
3. СОП ВКСМ для коррекции нарушения качества единиц хранения:	
3.1. Последовательное клонирование при загрязнении штаммов	6
3.2. Секвенирование генов рибосомных РНК на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl (Life Technologies, США)	7
3.3. Повторная криоконсервация при снижении жизнеспособности штаммов ниже установленного порога	8
4. СОП ВКСМ для мультисубстратного тестирования с помощью системы MicroPlate GENIII BioLog новых изолятов почвенных микроорганизмов	8
5. СОП ВКСМ для проведения генетической паспортизации штаммов с помощью метода геномного AFLP-фингерпринтинга	9

1. СОП ВКСМ для поддержания единиц хранения.

1.1. Криоконсервация штаммов при -150°C .

- 1.1.1. Приготовить по 200 мл питательных сред (г/л) – 3 вымытых и высушенных культуральных флакона: Мясо-пептонный агар (МПА): ГМФ агар - 20 или ГМФ бульона – 20, агар-агар - 20. Стерилизация 30 минут при 120°C . Мясо-пептонный бульон: ГМФ бульон – 20. Стерилизация 30 минут при 120°C . Среда R2A: R2A agar – 15. Стерилизация 30 минут при 120°C .
- 1.1.2. Разлить 10 чашек Петри с МПА или R2A (в зависимости от вида штамма) - по 20 мл в чашку.
- 1.1.3. Разлить 5 пробирок Falcon 15 мл с ГМФ бульоном – по 10 мл в пробирку.
- 1.1.4. Культивировать штамм микроорганизма при 28°C в течение 3 суток (до стационарной фазы роста) – 1 чашка, 1 микробиологическая петля.
- 1.1.5. Суспензировать полученную биомассу в ГМФ бульоне (титр суспензии 10^8 - 10^9 кл/мл) – 1 пробирка Falcon 15 мл, 4 микробиологические петли.
- 1.1.6. Добавить к суспензии стерильный глицерин Ultra Pure Grade – 2 мл глицерина, 1 наконечник.
- 1.1.7. Выдержать суспензию 40 мин при комнатной температуре.
- 1.1.8. Приготовить последовательные 10-кратные разведения суспензии – 4 пробирки Falcon 15 мл, 4 наконечника.
- 1.1.9. Высеять из каждого разведения по 100 мкл на 2 чашки Петри – 8 чашек, 1 наконечник.
- 1.1.10. Культивировать чашки Петри при 28°C в течение 2-10 суток до появления отдельных колоний.
- 1.1.11. Расфасовать суспензию в стерильные криопробирки на 1,5 мл (в криокоробках) - 4 криопробирки, 1 наконечник.
- 1.1.12. Разместить пробирки в морозильную камеру на -150°C .
- 1.1.13. По прошествии 1 суток переместить 2 криопробирки на 1,5 мл в морозильную камеру на -80°C .
- 1.1.14. После появления отдельных колоний на чашках Петри подсчитать исходный титр замороженных суспензий ($T_{\text{исх}}$).

1.2. Хранение штаммов при -80°C на Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов

- 1.2.1. Приготовить по 40 мл питательных сред (г/л) – 2 вымытых и высушенных культуральных флакона: Мясо-пептонный агар (МПА): ГМФ агар - 20 или ГМФ бульона – 20, агар-агар - 20. Стерилизация 30 мин, 120°C . Среда R2A: R2A agar – 15. Стерилизация 30 мин, 120°C .
- 1.2.2. Разлить 1 чашку Петри с МПА или R2A (в зависимости от вида штамма) – 20 мл.
- 1.2.3. Разлить 3 пробирки Falcon 15 мл с МПА или R2A (в зависимости от вида штамма) - по 6 мл в пробирку.
- 1.2.4. Выгрузить микропробирку с 2D баркодом из Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов.
- 1.2.5. Разморозить ее при 37°C в течение 3 мин.
- 1.2.6. Высеять суспензию на 1 чашку Петри и культивировать при 28°C в течение 3 суток.

- 1.2.7. Зафиксировать наличие роста и пересеять биомассу на пробирки Falcon 15 мл – 3 пробирки, 1 микробиологическая петля.
- 1.2.8. Культивировать 3 пробирки Falcon 15 мл при 28°C в течение 3 суток.
- 1.2.9. Хранить пробирки Falcon 15 мл при +4°C.

2. СОП ВКСМ для контроля качества единиц хранения.

2.1. Стандартные микробиологические рассевы.

- 2.1.1. Приготовить 200 мл питательной среды (г/л), в зависимости от вида штамма – 1 вымытый и высушенный культуральный флакон: Мясо-пептонный агар (МПА): ГМФ агар - 20 или ГМФ бульона – 20, агар-агар - 20. Стерилизация 30 мин, 120°C. Среда R2A: R2A agar – 15. Стерилизация 30 минут при 120°C.
- 2.1.2. Приготовить 50 мл мясо-пептонного бульона (г/л): ГМФ бульон – 20. Стерилизация 30 мин, 120°C.
- 2.1.3. Разлить 10 чашек Петри с МПА или R2A - по 20 мл в чашку.
- 2.1.4. Разлить 4 пробирки Falcon 15 мл с ГМФ бульоном – по 10 мл в пробирку.
- 2.1.5. Выгрузить микропробирку с 2D баркодом из Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов (или достать криопробирку из морозильной камеры).
- 2.1.6. Разморозить микропробирку (или криопробирку) при 37°C в течение 3 мин.
- 2.1.7. Отобрать 100 мкл суспензии в пробирку Falcon 15 мл – 1 пробирка Falcon 15 мл, 1 наконечник.
- 2.1.8. Приготовить последовательные 10-кратные разведения суспензии – 4 пробирки Falcon 15 мл, 4 наконечника.
- 2.1.9. Высеять из каждого разведения по 100 мкл на 2 чашки Петри – 8 чашек, 1 наконечник.
- 2.1.10. Культивировать чашки Петри при 28°C в течение 2-10 суток до появления отдельных колоний.
- 2.1.11. После появления отдельных колоний на чашках Петри подсчитать титр замороженных суспензий в процессе хранения (T_{xp}).
- 2.1.12. Рассчитать процент выживаемости для криоконсервированной культуры как $T_{xp} / T_{исх} \times 100\%$.
- 2.1.13. Пул из 10 – 20 колоний штамма пересеять на чашки Петри – 2 чашки, 1 микробиологическая петля.
- 2.1.14. Культивировать штамм микроорганизма при 28°C в течение 2 суток.
- 2.1.15. Хранить штамм микроорганизма при +4°C.

2.2. Световая микроскопия с использованием микроскопа Axiolab.

- 2.2.1. Нанести на предметное стекло каплю воды и внести биомассу клеток.
- 2.2.2. Тщательно перемешать.
- 2.2.3. Накрыть препарат покровным стеклом, избегая образования воздушных пузырей.
- 2.2.4. Для микроскопии использовать увеличение, соответствующее размеру объекта и целям исследования.
- 2.2.5. Зафиксировать следующие характеристики образца: однородность, размер и форму клеток (кокки, удлинённые или укороченные палочки), наличие форму и расположение

спор (центральное, апикальное), подвижность клеток (хаотичное или направленное движение).

2.3. Секвенирование генов рибосомных РНК на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl.

2.3.1. Приготовить 10 мл жидкой питательной среды R2A (г/л) – 1 культуральный флакон: R2A бульон – 15. Стерилизация 30 мин, 120°C.

2.3.2. Разлить 1 пробирку Falcon 15 мл с R2A бульоном – 10 мл в пробирку.

2.3.3. Засеять пробирку штаммом и культивировать на качалке при 28°C в течение 1-3 суток – 1 микробиологическая петля.

2.3.4. Отобрать 5 мл суспензии и использовать для выделения ДНК набор для выделения геномной ДНК (Fermentas) из различных источников в соответствии с рекомендациями производителя – 1 реакция, 5 наконечников.

2.3.5. Для амплификации использовать 50 нг выделенной ДНК, смесь для проведения ПЦР, включающую специфические праймеры и Taq-полимеразу – 1 реакция, 2 ед Taq-полимеразы, 5 наконечников.

2.3.6. ПЦР проводить в планшетах для проведения полимеразной цепной реакции – 1 планшет на 96 реакций, 1 наконечник.

2.3.7. Оценку результата проводить в агарозном 1,5% геле с участием маркера длины ДНК GeneRuler™ 1 kb Plus (75-20 000 п.н.) – 1 г агарозы; 2,5 мкг маркера; 2 наконечника.

2.3.8. Для выделения из геля и очистки ДНК использовать набор для выделения ДНК из агарозного геля и очистки продуктов ПЦР PureLink Combo – 1 реакция, 3 наконечника.

2.3.9. Секвенирование проводить на генетическом анализаторе ABI 3500xl с использованием набора для очистки продуктов секвенирования BigDye Xterminator и универсального полимера POP-7 – 1 набор BigDye Xterminator на 2500 реакций, 1 уп. полимера на 960 реакций, 4 наконечника.

2.4. Поиск гомологичных последовательностей в базе данных GenBank.

2.4.1. Выверенные последовательности ДНК анализировать с помощью базы данных NCBI GenBank и программы BLAST (Basic logical alignment search tool), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

2.4.2. Для конструирования филогенетического дерева применять программу MEGA5 и метод Neighbor-Joining (модель Maximum Composite Likelihood).

2.4.3. Для оценки уровней поддержки кластеров проводить бутстреп-анализ на основе 1000 повторов.

3. СОП ВКСМ для коррекции нарушения качества единиц хранения.

3.1. Последовательное клонирование при загрязнении штаммов.

3.1.1. Приготовить по 200 мл питательных сред (г/л) – 3 вымытых и высушенных культуральных флакона: Мясо-пептонный агар (МПА): ГМФ агар - 20 или ГМФ бульона – 20, агар-агар - 20. Стерилизация 30 минут при 120°C. Мясо-пептонный бульон: ГМФ бульон – 20. Стерилизация 30 минут при 120°C. Среда R2A: R2A agar – 15. Стерилизация 30 минут при 120°C.

3.1.2. Разлить 20 чашек Петри с МПА и R2A - по 20 мл в чашку.

- 3.1.3. Разлить 10 пробирок Falcon 15 мл с ГМФ бульоном – по 10 мл в пробирку.
- 3.1.4. Культивировать штамм микроорганизма при 28°C в течение 2 суток – 1 чашка, 1 микробиологическая петля.
- 3.1.5. Суспензировать полученную биомассу в ГМФ бульоне (титр суспензии 10⁷-10⁸ кл/мл) – 1 пробирка Falcon 15 мл, 1 микробиологическая петля.
- 3.1.6. Приготовить последовательные 10-кратные разведения суспензии – 4 пробирки Falcon 15 мл, 4 наконечника.
- 3.1.7. Высеять из каждого разведения по 100 мкл на 4 чашки Петри – 16 чашек, 2 наконечника.
- 3.1.8. Культивировать 8 чашек Петри с R2A при 28°C в течение 2-10 суток до появления отдельных колоний.
- 3.1.9. Культивировать 8 чашек Петри с МПА при 37°C в течение 3 суток до появления отдельных колоний.
- 3.1.10. Колонию очищенного штамма последовательно клонировать истощающим посевом на чашках Петри – 2 чашки, 6 микробиологических петель.
- 3.1.11. Пул из 10 – 20 колоний очищенного штамма пересеять на чашку Петри – 1 чашка, 2 микробиологические петли.
- 3.1.12. Культивировать штамм микроорганизма при 28°C в течение 2 суток.
- 3.1.13. Хранить штамм микроорганизма при +4°C.

- 3.2. Секвенирование генов рибосомных РНК на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl.
 - 3.2.1. Приготовить 10 мл жидкой питательной среды R2A (г/л) – 1 культуральный флакон: R2A бульон – 15. Стерилизация 30 мин, 120°C.
 - 3.2.2. Разлить 1 пробирку Falcon 15 мл с R2A бульоном – 10 мл в пробирку.
 - 3.2.3. Засеять пробирку штаммом и культивировать на качалке при 28°C в течение 1-3 суток – 1 микробиологическая петля.
 - 3.2.4. Отобрать 5 мл суспензии и использовать для выделения ДНК набор для выделения геномной ДНК (Fermentas) из различных источников в соответствии с рекомендациями производителя – 1 реакция, 5 наконечников.
 - 3.2.5. Для амплификации использовать 50 нг выделенной ДНК, смесь для проведения ПЦР, включающую специфические праймеры и Taq-полимеразу – 1 реакция, 2 ед Taq-полимеразы, 5 наконечников.
 - 3.2.6. ПЦР проводить в планшетах для проведения полимеразной цепной реакции – 1 планшет на 96 реакций, 1 наконечник.
 - 3.2.7. Оценку результата проводить в агарозном 1,5% геле с участием маркера длины ДНК GeneRuler™ 1 kb Plus (75-20 000 п.н.) – 1 г агарозы; 2,5 мкг маркера; 2 наконечника.
 - 3.2.8. Для выделения из геля и очистки ДНК использовать набор для выделения ДНК из агарозного геля и очистки продуктов ПЦР PureLink Combo – 1 реакция, 3 наконечника.
 - 3.2.9. Секвенирование проводить на генетическом анализаторе ABI 3500xl с использованием набора для очистки продуктов секвенирования BigDye Xterminator и универсального полимера POP-7 – 1 набор BigDye Xterminator на 2500 реакций, 1 уп. Полимера на 960 реакций, 4 наконечника.

- 3.3. Повторная криоконсервация при снижении жизнеспособности штаммов ниже установленного порога.
- 3.3.1. Приготовить по 200 мл питательных сред (г/л) – 3 вымытых и высушенных культуральных флакона: Мясо-пептонный агар (МПА): ГМФ агар - 20 или ГМФ бульона – 20, агар-агар - 20. Стерилизация 30 мин, 120°C. Мясо-пептонный бульон: ГМФ бульон – 20. Стерилизация 30 мин, 120°C. Среда R2A: R2A agar – 15. Стерилизация 30 мин, 120°C.
- 3.3.2. Разлить 10 чашек Петри с МПА или R2A - по 20 мл в чашку.
- 3.3.3. Разлить 5 пробирок Falcon 15 мл с ГМФ бульоном – по 10 мл в пробирку.
- 3.3.4. Культивировать штамм микроорганизма при 28°C в течение 3 суток (до стационарной фазы роста) – 1 чашка, 1 микробиологическая петля.
- 3.3.5. Суспензировать полученную биомассу в ГМФ бульоне (титр суспензии 10⁸-10⁹ кл/мл) – 1 пробирка Falcon 15 мл, 4 микробиологические петли.
- 3.3.6. Добавить к суспензии стерильный глицерин Ultra Pure Grade – 2 мл глицерина, 1 наконечник.
- 3.3.7. Выдержать суспензию 40 мин при комнатной температуре.
- 3.3.8. Приготовить последовательные 10-кратные разведения суспензии – 4 пробирки Falcon 15 мл, 4 наконечника.
- 3.3.9. Высеять из каждого разведения по 100 мкл на 2 чашки Петри – 8 чашек, 1 наконечник.
- 3.3.10. Культивировать чашки Петри при 28°C в течение 2-10 суток до появления отдельных колоний.
- 3.3.11. Расфасовать суспензию в стерильные криопробирки на 1,5 мл (в криокоробках) и микропробирки с 2D баркодом на 300 мкл (в планшетах) - 2 криопробирки, 12 микропробирок, 2 наконечника.
- 3.3.12. Разместить 2 криопробирки в морозильную камеру на -80°C, 12 микропробирок – в Станцию низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов.
- 3.3.13. После появления отдельных колоний на чашках Петри подсчитать исходный титр замороженных суспензий ($T_{исх}$).

4. СОП ВКСМ для мультисубстратного тестирования с помощью системы MicroPlate GENIII BioLog новых изолятов почвенных микроорганизмов.

- 4.1. Приготовить по 40 мл питательных сред (г/л) – 2 вымытых и высушенных культуральных флакона: Мясо-пептонный агар (МПА): ГМФ агар - 20 или ГМФ бульона – 20, агар-агар - 20. Стерилизация 30 мин, 120°C. Среда R2A: R2A agar – 15. Стерилизация 30 мин, 120°C.
- 4.2. Разлить 1 чашку Петри с МПА или R2A (в зависимости от вида штамма) – 20 мл.
- 4.3. Высеять штамм на чашку Петри и культивировать при 28°C в течение 2 суток.
- 4.4. Биомассу использовать для приготовления суспензий в инокулирующих жидкостях IF-AB с использованием турбидиметра – 1 пробирка.
- 4.5. Приготовленные суспензии по 100 мкл разнести в лунки 96-луночных микропланшетов ID Microplate (BioLog) – 1 микропланшет, 1 наконечник к дозатору Ovation.
- 4.6. Микропланшет инкубировать при 33°C в течение 1 - 7 суток.

4.7. Результат инкубирования в виде наличия (+) или отсутствия (-) окрашивания каждой лунки проанализировать с помощью компьютерной программы MicroLogMSystem.

5. СОП ВКСМ для проведения генетической паспортизации штаммов с помощью метода геномного AFLP-фингерпринтинга

5.1. Приготовить 10 мл жидкой питательной среды R2A (г/л) – 1 культуральный флакон: R2A бульон – 15. Стерилизация 30 мин, 120°C.

5.2. Разлить 1 пробирку Falcon 15 мл с R2A бульоном – 10 мл в пробирку.

5.3. Засеять пробирку штаммом и культивировать на качалке при 28°C в течение 1-3 суток – 1 микробиологическая петля.

5.4. Отобрать 5 мл суспензии и использовать для выделения ДНК набор для выделения геномной ДНК (Fermentas) из различных источников в соответствии с рекомендациями производителя – 1 реакция, 5 наконечников.

5.5. Выделенную геномную ДНК (50 нг) использовать для реакции рестрикции с помощью рестриктаз *MseI* и *EcoRI* - по 2,5 ед, 4 наконечника.

5.6. Реакцию проводить при 37°C в течение 16 часов.

5.7. Для амплификации использовать 4 мкл реакционной смеси, смесь для проведения ПЦР, включающую специфические праймеры и Taq-полимеразу – 1 реакция, 2 ед Taq-полимеразы, 5 наконечников.

5.8. ПЦР проводить в планшетах для проведения полимеразной цепной реакции – 1 планшет на 96 реакций, 1 наконечник.

5.9. Первичную оценку результата проводить в агарозном 1,5% геле с участием маркера длины ДНК GeneRuler™ 1 kb Plus (75-20 000 п.н.) – 1 г агарозы; 2,5 мкг маркера; 2 наконечника.

5.10. Финальную амплификацию проводить в условиях автоматического капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3500x1 с использованием интернального стандарта молекулярного веса GeneScan™ 600 LIZ и универсального полимера POP-7 – 1 уп. стандарта на 800 реакций, 1 уп. полимера на 960 реакций, 2 наконечника.

5.11. Файлы, полученные после электрофоретического разделения фрагментов и содержащие «кривые», соответствующие фрагментам AFLP (FAM) и стандарту молекулярного веса (LIZ) анализировать с помощью программы Bionumerics для определения точного размера AFLP-фрагментов.