



Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (КММ)
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН)

№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 1 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

Стандартная операционная процедура «Выделение геномной ДНК из штаммов грибов»

СОП-007

УТВЕРЖДАЮ
И.о. директора ТИБОХ ДВО РАН, к.б.н.
Черников О.В.
2021 г.



Место нахождения документа: Электронная копия: Бумажная копия: Лаборатория морской биохимии, комната 219, папка «СОПы»		
Документ подготовлен: н.с., к.х.н. Чаусова В.Е. 14.10.2021	Документ проверен: зав. ЛМБХ, к.м.н. Исаева М.П. 14.10.2021	Документ согласован: чл.-корр., д.б.н. Михайлов В.В. 14.10.2021

Владивосток 2021



№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 2 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

гДНК – геномная ДНК;

СОП – стандартная операционная процедура;

g - относительное ускорение центрифуги.



№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 3 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

1. ВВЕДЕНИЕ

Стандартная операционная процедура «Выделение геномной ДНК из штаммов грибов» - СОП-007 разработана в рамках научного проекта по теме «Развитие биоресурсной коллекции «Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН» для реализации Федеральной программы в области генетических технологий» (грант Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 15.BRK.21.0004, соглашение № 075-15-2021-1052 от «29» сентября 2021 года).

В документе подробно описываются протоколы выделения, оценки качества и количества геномной ДНК из штаммов грибов из Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН, а также требования к организации и условиям проведения экспериментальных процедур.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Стандартная операционная процедура разработана для стандартизации процесса выделения геномной ДНК из культур грибов с целью дальнейшей ПЦР-амплификации и секвенирования их генов.

Данный документ может быть использован сотрудниками лаборатории, выполняющими данную процедуру, а также для обучения нового персонала.

3. ИСТОРИЯ ВНЕСЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ

Отсутствует.

4. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА

Следование правилам техники безопасности и санитарного режима на рабочем месте является неукоснительным требованием для соблюдения всем персоналом, допущенным к работе в лаборатории.

В лаборатории имеется комплект инструкций по технике безопасности по каждому виду лабораторных работ. Ответственность за организацию безопасных условий труда в лаборатории возлагается в соответствии с приказом по учреждению на руководителя соответствующего подразделения или специально назначенное ответственное лицо.



№: СОП- 007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 4 из 11
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

Каждый сотрудник получает первичный инструктаж по технике безопасности при приеме на работу или возвращении к данному виду деятельности после длительного перерыва. Повторный плановый инструктаж проводят ежегодно, а внеплановый – при возникновении аварийных ситуаций или по распоряжению администрации учреждения. О прохождении инструктажа и допуске к самостоятельной работе в лаборатории делают отметку под роспись сотрудника в «Журнале проведения инструктажа по технике безопасности».

5. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПЕРСОНАЛА

Сотрудники лаборатории несут персональную ответственность за выполнение ими правил техники безопасности, соблюдение санитарного и противопожарного режимов на рабочем месте.

Сотрудникам лаборатории запрещено без разрешения руководителя подразделения выносить за пределы рабочей зоны исследуемые образцы и рабочую документацию лаборатории.

Сотрудники лаборатории обеспечивают качественное выполнение подготовки образцов к исследованиям, соблюдают правила проведения всех этапов исследования и своевременно предоставляют результаты исследований в соответствии с разработанными условиями (заполнение рабочего журнала, ведение электронной отчетности). Сотрудники лаборатории рационально используют реактивы и расходные материалы, обеспечивают сохранность лабораторного оборудования и лабораторных образцов на всех этапах исследования.

№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 5 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Оборудование

- бокс биологической безопасности («Ламинарные системы», Россия) или аналог;
- холодильник с морозильной камерой;
- центрифуга Eppendorf 5430R («Eppendorf», Германия) или аналог;
- микроцентрифуга настольная Multi-spin MSC-6000 («Biosan», Латвия) или аналог;
- вортекс BioVortex V1 («Biosan», Латвия) или аналог;
- термостат настольный Thermo Block TDB-120 («Biosan», Латвия) или аналог;
- магнитный штатив для пробирок на 1,5 мл DynaMag™ 2 («Life Technologies», США) или аналог;
- камера для горизонтального электрофореза («Labtech», Италия) или аналог;
- источник питания постоянного тока («SCIE-PLAS», Великобритания) или аналог;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- аналитические весы;
- гель-документирующая система iBright FL1500 («Thermo Fisher Scientific», США) или аналог;
- наноспектрофотометр Nanophotometer («Implen», Германия);
- микропипетки одноканальные на 0,5–2,5, 2–20, 10–100, 20–200, 100–1000 мкл («Eppendorf», Германия) или аналог.

6.2. Расходные материалы

- пробирки на 0,2 мл, 1,5 мл («Axygen Scientific Inc.», США, «Thermo Fisher Scientific», США) или аналог;
- пестики пластиковые стерильные;
- шпатель;
- перчатки латексные неопудренные;
- маркеры перманентные;
- наконечники для микропипеток («Axygen», США, «Thermo Fisher Scientific», США) или аналог;



№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 6 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

- салфетки безворсовые;
- планшет и гребенка для электрофореза;
- колба стеклянная плоскодонная на 250 мл;
- стакан мерный на 100 мл.

6.3. Реактивы

- набор для выделения ДНК «MagJET™ Plant Genomic DNA Kit» («Thermo Fisher Scientific», США);
- стеклянные шарики Glass beads Acid washed («Sigma», США);
- спирт 96 %;
- лед;
- вода деионизованная (mQ);
- ТАЕ-буфер;
- краситель для электрофореза;
- ДНК фага λ (50 нг/мкл) («Сибэнзим», Россия) или аналог;
- агароза LE2 («Helicon», Россия) или аналог;
- раствор бромистого этидия.



№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 7 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

7. ПРОЦЕДУРА

В качестве биологического материала для исследования используются чистые культуры грибов, полученные микробиологическими методами.

7.1. Общие положения

Выделение ДНК проводится в боксе биологической безопасности во избежание загрязнения помещения и последующей контаминации реакционных смесей чужеродной ДНК.

Подготовку бокса проводят до начала работ, обеззараживание – по их окончании в соответствии с правилами санитарного режима в подразделении.

7.2. Выделение геномной ДНК из штаммов грибов

Для выделения геномной ДНК из штаммов морских грибов используется коммерческий набор «MagJET™ Plant Genomic DNA Kit» («Thermo Fisher Scientific», США). В наборе применяется технология выделения нуклеиновых кислот с магнитными частицами, исключающая необходимость экстракции фенолом/хлороформом или пересадения со спиртом.

Процедура выделения геномной ДНК из штаммов грибов проводится в соответствии с протоколом производителя к набору «MagJET™ Plant Genomic DNA Kit» («Thermo Scientific», США):

- перед первым использованием набора приготовьте промывочные буферы Wash Buffer 1 и Wash Buffer 2 путем добавления к ним 135 мл и 180 мл 96 % этанола соответственно;
- поместите 1,5 мл пробирки с осадками исследуемых культур грибов в бокс биологической безопасности;
- добавьте в каждую пробирку стеклянные шарики (silica beads) в объеме $\frac{1}{2}$ от объема осадка с использованием шпателя;
- гомогенизируйте осадки с использованием пестика и стеклянных шариков путем растирания в течение 1-2 мин;
- добавьте в пробирки 350 мкл буфера для лизирования клеток Lysis Buffer A и ресуспендируйте смесь на вортексе в течение 10-20 сек;



№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 8 из 111
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

- добавьте в пробирки 50 мкл Lysis Buffer B и 20 мкл RNase A и ресуспендируйте смесь на вортексе в течение 10-20 сек;
- инкубируйте пробирки с образцами в термостате при 65 °С, периодически перемешивая их;
- добавьте 130 мкл Precipitation Solution и перемешайте смесь в пробирке путем переворачивания 2-3 раза;
- инкубируйте пробирки на льду в течение 5 мин;
- центрифугируйте пробирки с образцами 5 мин при 14000 g;
- подготовьте и промаркируйте необходимое количество новых пробирок на 1,5 мл;
- после центрифугирования перенесите 400 мкл супернатанта, не задевая осадка, в приготовленные пробирки;
- добавьте к каждому лизату 25 мкл предварительно ресуспендированных магнитных частиц MagJET Magnetic Beads;
- добавьте 400 мкл 96 % этанола и перемешайте содержимое пробирок на вортексе до получения равномерной суспензии;
- сбросьте капли смеси со стенок пробирок с помощью настольной микроцентрифуги, после чего инкубируйте образцы при комнатной температуре в течение 1 мин;
- поместите пробирки в магнитный штатив и подождите 1-2 мин пока магнитные частицы не сформируют плотный осадок;
- не убирая пробирки из штатива, полностью удалите из них супернатант;
- уберите пробирки с магнитными частицами из магнитного штатива, добавьте в них 800 мкл Wash Buffer 1 и ресуспендируйте смесь на вортексе;
- сбросьте капли смеси со стенок пробирок с помощью настольной микроцентрифуги, после чего инкубируйте образцы при комнатной температуре в течение 1 мин;
- поместите пробирки в магнитный штатив и подождите 1-2 мин пока магнитные частицы не сформируют плотный осадок;
- не убирая пробирки из штатива, полностью удалите из них супернатант;
- уберите пробирки с магнитными частицами из магнитного штатива, добавьте в них 800 мкл Wash Buffer 2 и ресуспендируйте смесь на вортексе;

№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 9 из 111
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

- сбросьте капли смеси со стенок пробирок с помощью настольной микроцентрифуги, после чего инкубируйте образцы при комнатной температуре в течение 1 мин;
- поместите пробирки в магнитный штатив и подождите 1-2 мин пока магнитные частицы не сформируют плотный осадок;
- не убирая пробирки из штатива, полностью удалите из них супернатант;
- повторите процедуру отмывки с использованием Wash Buffer 2;
- высушите полученные осадки магнитных частиц от спирта в термостате при 37 °С в течение 5 мин, открыв крышки пробирок;
- добавьте в пробирки 50 мкл Elution Buffer и тщательно перемешайте смесь на вортексе;
- инкубируйте пробирки при 70 °С в течение 5 мин, периодически помешивая;
- сбросьте капли смеси со стенок пробирок с помощью настольной микроцентрифуги, после чего поместите пробирки в магнитный штатив и подождите 5 мин пока магнитные частицы не сформируют плотный осадок;
- приготовьте и промаркируйте необходимое количество новых пробирок на 1,5 мл;
- не убирая пробирки с образцами из магнитного штатива, аккуратно перенесите супернатант, содержащий гДНК грибов, в новые пробирки.

Хранение пробирок с выделенными образцами гДНК осуществляется в морозилке при –20 °С, избегая их многократного размораживания / замораживания.

7.3. Оценка качества и количества выделенной геномной ДНК

Для оценки качества и количества выделенных образцов гДНК микроорганизмов используют методы гель-электрофореза и спектрофотометрии.

7.3.1. Гель-электрофорез образцов гДНК

Визуализацию и полуколичественный анализ гДНК проводят при помощи метода гель-электрофореза в 1 % агарозном геле, используя ДНК фага λ известной концентрации в качестве контроля.

Процедура гель-электрофореза включает следующие этапы:

В камеру для электрофореза залейте 1xTAE буфер.

№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 10 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

Приготовьте 1 % агарозный гель. Для этого к 1 г агарозы добавьте 100 мл 1хТАЕ-буфера. Приготовленную смесь расплавьте в СВЧ-печи. Расплавленную агарозу немного охладите и залейте в планшет для геля. Установите в планшете гребенку, используя зажим, для получения лунок для внесения образцов. После полимеризации агарозы выньте гребенку из геля и перенесите планшет с гелем в камеру для электрофореза.

Аликвоты исследуемых образцов ДНК (2-4 мкл) и контрольной ДНК фага λ известной концентрации, предварительно смешанные с красителем на основе бромфенолового синего, внесите в лунки геля в соответствии с нумерацией проб.

Проведите электрофорез при напряжении 90 В в течение 40-60 мин. Контроль над электрофоретическим разделением осуществлять визуально по движению фронта красителя. После окончания электрофореза гель с образцами в течение 10 минут окрасьте в растворе бромистого этидия, а затем отмойте в деионизованной воде. Результаты электрофореза анализируйте в ультрафиолетовом свете с использованием гель-документирующей системы iBright FL1500 («Thermo Fisher Scientific», США).

Образец целостной ДНК на электрофореграмме представлен единственной четко очерченной полосой в верхней части агарозного геля. Деградированный образец ДНК характеризуется появлением пятна ниже основной полосы, которое будет тем более выраженным, чем сильнее деградация образца.

Относительную концентрацию образцов ДНК осуществляют путем визуального сравнения интенсивности полос с контрольной ДНК.

7.3.2. Спектрофотометрический анализ образцов гДНК

После гель-электрофореза проводят оценку качества и количества выделенных образцов гДНК с использованием наноспектрофотометра («Implen», Германия) в соответствии с инструкцией к прибору.

Поместите в прибор кювету и выберите необходимую крышку - Lid 10. Включите прибор и выберите протокол для измерения двухцепочечной ДНК.

В качестве образца для первого измерения используйте элюирующий буфер из набора для выделения ДНК. Внесите 1-2 мкл буфера на оптическую поверхность кюветы, закройте кювету крышкой и нажмите кнопку, соответствующую Blank на панели прибора. После



№: СОП-007	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 11 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

завершения измерения, снимите крышку и протрите поверхность кюветы безворсовой чистой салфеткой.

Далее проведите измерения последовательно для всех исследуемых образцов. Для этого внесите 1-2 мкл образца на оптическую поверхность кюветы, накройте крышкой и нажмите на панели прибора кнопку, соответствующую Sample. После каждого образца протрите поверхность кюветы салфеткой и дополнительно промойте поверхность 5 мкл деионизованной воды.

Для каждого образца ДНК прибор автоматически рассчитает концентрацию в нг/мкл и отношение поглощения A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} .

Образец ДНК считается чистым, если отношение значений A_{260}/A_{280} находится в диапазоне 1,75 – 2,10. В случае меньших значений показателя A_{260}/A_{280} образец может содержать значительное количество примесей белка, фенола или иных контаминирующих агентов, имеющих значительное поглощение при 280 нм. Показатель A_{260}/A_{280} , значительно превышающий 2,10 может свидетельствовать о большом количестве РНК в исследуемом образце.

В случае неудовлетворительных показателей A_{260}/A_{280} рекомендовано провести дополнительную очистку образца ДНК с использованием протеиназы, РНКазы или пересадения со спиртом в зависимости от значения A_{260}/A_{280} .