



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

No: СОП-008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия No: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 1 из 12
----------------	-----------------------------------	----------------------	----------------------------------	--------------

Стандартная операционная процедура «ПЦР-амплификация фрагмента гена 16S
рРНК бактериальных штаммов с последующей очисткой»

СОП-008

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



Место нахождения документа:

Электронная копия: Лаборатория морской биохимии, серверный компьютер, диск D, папка «СОПы»

Бумажная копия: ТИБОХ ДВО РАН, Лаборатория морской биохимии, комната 219, папка «СОПы»

Документ подготовлен:
м.н.с. Быстрицкая Е.П.


15.10.2021

Документ проверен:
зав. ЛМБХ, к.м.н. Исаева М.П.


15.10.2021

Документ согласован:
чл.-корр., д.б.н. Михайлов В.В.


15.10.2021

Владивосток 2021



№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 2 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

гДНК – геномная ДНК;

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфаты;

об/мин – оборотов в минуту;

п.н. – пар нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СОП – стандартная операционная процедура;

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;

g - относительное ускорение центрифуги.

№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 3 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

1. ВВЕДЕНИЕ

Стандартная операционная процедура «ПЦР-амплификация фрагмента гена 16S рРНК бактериальных штаммов с последующей очисткой» - СОП-008 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 постановки ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК бактерий, визуализации результатов и очистки продуктов реакции, а также требования к организации и условиям проведения экспериментальных процедур.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Стандартная операционная процедура разработана для стандартизации процессов ПЦР-амплификации гена 16S рРНК бактериальных штаммов и подготовки продуктов реакции к секвенированию.

Этот 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– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 4 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

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.

No: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия No: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 5 из 12
-----------------	-----------------------------------	----------------------	----------------------------------	--------------

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Оборудование

- ламинарные боксы – 2 шт. («Ламинарные системы», Россия) или аналог;
- амплификатор 2720 Thermal Cycler («Applied Biosystems», США) или аналог;
- холодильник с морозильной камерой;
- центрифуга Eppendorf 5430 («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;
- 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;
- перчатки латексные неопудренные;
- маркеры перманентные;
- наконечники для микропипеток («Axygen», США, «Thermo Fisher Scientific», США) или аналог;
- наконечники для вырезания геля для микропипетки 100-1000 мкл («Axygen Scientific Inc.», США)
- салфетки безворсовые;

№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 6 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

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

6.3. Реактивы

- 10х дНТФ – по 2 мМ каждого («Сибэнзим», Россия) или аналог;
- GoTaq ДНК-полимераза Flexi («Promega», США)
- 5х буфер для GoTaq ДНК-полимеразы Flexi («Promega», США)
- $MgCl_2$ для GoTaq ДНК-полимеразы Flexi («Promega», США);
- вода деионизованная (mQ);
- праймеры для амплификации («Евроген», Россия);
- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent («Thermo Fisher Scientific», США);
- набор Cleanup Mini («Евроген», Россия);
- ТАЕ-буфер;
- краситель для электрофореза на основе бромфенолового синего;
- ДНК-маркер 100 п.н. + 1,5 т.п.н. + 3 т.п.н. («Сибэнзим», Россия) или аналог;
- агароза LE2 («Helicon», Россия) или аналог;
- раствор бромистого этидия.

№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 7 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

7. ПРОЦЕДУРА

В качестве материала для исследования используются образцы геномной ДНК бактериальных культур с известной концентрацией.

7.1. Общие положения

Приготовление реакционных смесей для амплификации и внесение образцов ДНК проводится в отдельных ламинарных боксах во избежание загрязнения помещения и последующей контаминации растворов чужеродной ДНК.

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

7.2. ПЦР-амплификация фрагмента гена 16S рРНК бактериальных штаммов

Для получения фрагмента гена 16S рРНК проводится ПЦР с использованием специфичных олигонуклеотидных праймеров, последовательности которых представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК

Название	5'→3' последовательность	Ориентация	Длина	Температура отжига, °C
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Прямая	20	55
1492R	TACGGTTACCTTGTTACGACTT	Обратная	22	55

Состав и объем компонентов реакции для каждого образца представлены в таблице 2.

№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 8 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

Таблица 2 – Состав реакционной смеси для одного образца

5X GoTaq Flexi-буфер	4 мкл
10X дНТФ (2 мМ)	2 мкл
10X Прямой праймер (5 мкМ)	2 мкл
10X Обратный праймер (5 мкМ)	2 мкл
100X ДНК-полимераза GoTag Flexi	0,2 мкл
16,66x MgCl ₂ (25 мМ)	1,2 мкл
mQ H ₂ O	7,6 мкл
Образец ДНК (5-50 нг/мкл)	1 мкл

Процедура постановки ПЦР включает следующие этапы:

- перед началом эксперимента рассчитайте объем компонентов реакционной смеси с учетом количества исследуемых образцов;
- разморозьте и ресуспендируйте все необходимые компоненты реакционной смеси в подготовленном ламинарном боксе;
- приготовьте и промаркируйте необходимое количество пробирок на 0,2 мл, равное количеству образцов, и одну пробирку на 1,5 мл для приготовления общей реакционной смеси;
- приготовьте общую реакционную смесь в пробирке на 1,5 мл, включающую все компоненты за исключением образцов ДНК, ресуспендируйте и центрифугируйте ее;
- внесите в подготовленные пробирки на 0,2 мл по 19 мкл реакционной смеси;
- уберите все компоненты для реакции обратно в морозильную камеру;
- пробирки с раскапанной реакционной смесью перенесите в ламинарный бокс для внесения образцов ДНК;
- разморозьте и центрифугируйте исследуемые образцы ДНК;
- внесите в пробирки с реакционной смесью по 1 мкл образца ДНК;
- ресуспендируйте и центрифугируйте пробирки;
- включите амплификатор и установите в него пробирки с образцами;
- задайте температурный режим реакции (таблица 3), укажите объем 20 мкл и нажмите Start.

№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 9 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

Таблица 3 – Температурный режим ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	20 сек	30
Отжиг праймеров	55	20 сек	
Элонгация	72	1 мин 30 сек	
Завершающая элонгация	72	5 мин	1
Охлаждение и хранение	22	∞	-

По завершении реакции хранение продуктов ПЦР-амплификации осуществляется при -20 °C.

7.3. Визуализация продуктов ПЦР-амплификации и оценка их концентрации

7.3.1. Гель-электрофорез образцов гДНК

Детекцию и визуализацию продуктов реакции проводят при помощи метода гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле, используя ДНК-маркер 100 п.н. + 1,5 т.п.н. + 3 т.п.н. («Сибэнзим», Россия) в качестве контроля.

Процедура гель-электрофореза включает следующие этапы:

В камеру для электрофореза залейте 1хТАЕ буфер.

Приготовьте 1,5 % агарозный гель. Для этого к 1,5 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 (2-4 мкл), предварительно смешанных с красителем на основе бромфенолового синего, внесите в лунки геля в соответствии с нумерацией проб. В одну из свободных лунок добавьте 5 мкл ДНК-маркера.

Проведите электрофорез при напряжении 90 В в течение 40-60 мин. Контроль над электрофоретическим разделением осуществляйте визуально по движению фронта

№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 10 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

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 геле-документирующей системы iBright FL1500 («Thermo Fisher Scientific», США). Проведите оценку размеров ПЦР-продуктов относительно ДНК-маркера 100 п.н. + 1,5 т.п.н. + 3 т.п.н. («Сибэнзим», Россия).

Целевой продукт реакции, соответствующий фрагменту гена 16S рРНК, на электрофореграмме представлен полосой длиной около 1500 п.н.

В случае отсутствия на электрофореграмме полосы ожидаемой длины необходимо провести дополнительную оптимизацию условий ПЦР-амплификации и протокола выделения гДНК для данного образца.

7.3.2. Спектрофотометрический анализ ПЦР-продуктов

После гель-электрофореза проводят оценку количества целевых ПЦР-продуктов 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 деионизованную воду (mQ H₂O). Внесите 1-2 мкл воды на оптическую поверхность кюветы, закройте кювету крышкой и нажмите кнопку, соответствующую Blank на панели прибора. После 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} .

№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 11 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

7.4. Очистка продуктов ПЦР-амплификации

Для дальнейшего секвенирования последовательностей полученных ПЦР-продуктов необходимо провести процедуру их очистки от компонентов реакционной смеси и неспецифических фрагментов. Для этого могут быть использованы два метода. В случае наработки только ампликонов ожидаемой длины проводится ферментативная очистка образца с использованием ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent («Thermo Fisher Scientific», США). В случае присутствия в образце дополнительных неспецифических фрагментов проводится вырезание целевого продукта из агарозного геля с последующей очисткой на колонках с использованием набора CleanUp Mini («Евроген», Россия).

7.4.1. Очистка ПЦР-продуктов с использованием ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent

Приготовьте и промаркируйте необходимое количество пробирок на 0,2 мл. Достаньте фермент и поместите его на холодогент.

Смешайте в пробирке 2,5 мкл ПЦР-продукта с 1 мкл фермента ExoSap.

В случае низкой концентрации образца (менее 10 нг/мкл) смешайте в пробирке 5 мкл ПЦР-продукта с 2 мкл фермента ExoSap.

Ресуспандируйте и центрифугируйте пробирки. Поместите их в амплификатор. Включите прибор и задайте следующие параметры температурного режима: 37 °C – 15 мин, 80 °C – 15 мин, 22 ° - ∞. Запустите программу.

После завершения реакции очищенные образцы хранятся при -20 °C до дальнейшего исследования.

7.4.2. Очистка ПЦР-продуктов с использованием набора CleanUp Mini («Евроген», США)

Проведите гель-электрофорез исследуемых образцов согласно п. 7.3.1. данной СОП. Приготовьте агарозный гель с широкими карманами, смешайте весь объем образцов с красителем на основе бромфенолового синего и внесите их в лунки геля.

Для каждого исследуемого образца приготовьте и взвесьте пробирку на 1,5 мл.

№: СОП– 008	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 12 из 12
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

После регистрации результатов электрофореза в УФ-свете для каждого образца вырежьте специфическую полосу с использованием специальных наконечников и перенесите ее в приготовленную промаркированную пробирку.

Процедура очистки включает следующие этапы:

- взвесьте фрагменты геля для каждого образца;
- добавьте к ним 3 объема «Связывающего раствора» (но не менее 350 мкл);
- инкубируйте смеси при 50–55 °С до полного растворения геля, периодически встряхивая пробирки;
- приготовьте необходимое количество спин-колонок, поместив их в приемники;
- перенесите пробы в колонки и центрифугируйте 30 секунд при 7000 g;
- удалите фильтрат из собирательных пробирок;
- добавьте в колонки 750 мкл «Промывочного раствора»;
- центрифугируйте их 30 секунд при 7000 g;
- удалите фильтрат из собирательных пробирок;
- центрифугируйте пустые колонки 60 секунд при 7000 g для полного удаления промывочного раствора;
- поместите колонки в новые заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл;
- нанесите в центр мембраны колонок 12-20 мкл элюирующего раствора;
- центрифугируйте колонки с пробирками 30 секунд при 7000 g.

Измерьте концентрацию полученных образцов на наноспектрофотометре согласно п. 7.3.2. данной СОП.

Очищенная ДНК пригодна для дальнейшего секвенирования.