



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

№: СОП-006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 1 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

**Стандартная операционная процедура «Выделение геномной ДНК из
бактериальных штаммов»**

СОП-006

УТВЕРЖДАЮ
И.о. директора ТИБОХ ДВО РАН, к.б.н.
Черников О.В.
14.10.2021 г.



Место нахождения документа:

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

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

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


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-006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 2 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

гДНК – геномная ДНК;

СОП – стандартная операционная процедура;

g - относительное ускорение центрифуги.



№: СОП-006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 3 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

1. ВВЕДЕНИЕ

Стандартная операционная процедура «Выделение геномной ДНК из бактериальных штаммов» - СОП-006 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 бактериальных штаммов, а также требования к организации и условиям проведения экспериментальных процедур.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Стандартная операционная процедура разработана для стандартизации процесса выделения геномной ДНК из бактериальных культур с целью дальнейшего полногеномного секвенирования или ПЦР-амплификации 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.

Каждый сотрудник получает первичный инструктаж по технике безопасности при приеме на работу или возвращении к данному виду деятельности после длительного



№: СОП-006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 4 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

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 проведения 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-006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 5 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

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;
- 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;
- петли микробиологические стерильные;
- перчатки латексные неопудренные;
- маркеры перманентные;
- наконечники для микропипеток («Axygen», США, «Thermo Fisher Scientific», США) или аналог;
- салфетки безворсовые;
- планшет и гребенка для электрофореза;
- колба стеклянная плоскодонная на 250 мл;



№: СОП-006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 6 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

- стакан мерный на 100 мл.

6.3. Реактивы

- набор для выделения ДНК «NucleoSpin® Tissue» («Macherey-Nagel», Германия);
- вода деионизованная (mQ);
- спирт 96 %;
- ТАЕ-буфер;
- краситель для электрофореза на основе бромфенолового синего;
- ДНК фага λ (50 нг/мкл) («Сибэнзим», Россия) или аналог;
- агароза LE2 («Helicon», Россия);
- раствор бромистого этидия.

№: СОП- 006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 7 из 10
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

7. ПРОЦЕДУРА

В качестве биологического материала для исследования используются чистые бактериальные культуры, 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 бактериальных штаммов

Для выделения геномной ДНК из бактериальных штаммов используется коммерческий набор «NucleoSpin® Tissue» («Macherey-Nagel», Германия)». Набор предназначен для выделения ДНК из тканей, клеток (в том числе бактериальных) и других источников.

Процедура выделения геномной ДНК из штаммов бактерий проводится в соответствии с протоколом производителя к набору «NucleoSpin® Tissue» («Macherey-Nagel», Германия)»:

- приготовьте и промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл;
- в каждую пробирку внести 200 мкл буфера Т1 из набора для выделения;
- поместите чашки Петри с исследуемыми бактериальными культурами в бокс биологической безопасности;
- стерильной микробиологической петлей перенесите около 10 мг (несколько колоний) бактериальной культуры с поверхности чашки Петри с питательной средой в индивидуальную промаркированную пробирку с буфером Т1, после чего тщательно ресуспендируйте на вортексе;
- ресуспендированные образцы смешайте с 25 мкл протеиназы К и добавьте 200 мкл буфера В3 с последующим перемешиванием;
- инкубируйте образцы в термостате в течение 10 минут при 70 °С;
- после инкубации добавьте 210 мкл 96 % этанола и аккуратно перемешайте;



№: СОП- 006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 8 из 10
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

- приготовьте необходимое количество колонок (равное количеству образцов), промаркируйте их и поместите в приемники;
- перенесите исследуемые образцы из пробирок в колонки, после чего центрифугируйте их в течение 1 мин при 11000 g;
- удалите супернатант из приемников колонок;
- добавьте в колонки 500 мкл отмывающего буфера (WB);
- центрифугируйте колонки 1 мин при 11000 g;
- удалите супернатант из приемников колонок;
- добавьте в колонки 600 мкл буфера В5;
- центрифугируйте колонки 1 мин при 11000 g;
- удалите из приемников колонок супернатант и повторите центрифугирование 1 мин при 11000 g;
- приготовьте и промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл;
- колонки поместите в приготовленные пробирки и добавьте 100 мкл элюирующего буфера ВЕ;
- инкубируйте колонки при комнатной температуре в течение 1 минуты;
- центрифугируйте колонки с пробирками в течение 1 мин 11000 g, в результате чего супернатант, содержащий выделенную гДНК бактерий переносится в пробирки.

Хранение пробирок с выделенными образцами гДНК осуществляйте 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:

№: СОП- 006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 9 из 10
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

В камеру для электрофореза залейте 1хТАЕ буфер.

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



№: СОП-006	Дата создания: 14 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 14 октября 2021	Стр. 10 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

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} .

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} .