

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН)**

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской
академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)



[Signature]
чл.-корр. РАН Попов

[Signature] 2017

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ
ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ МАРКЕРНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
в ЦКП «Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных
физиологических групп биотехнологического назначения (UNIQEM)»
(ЦКП «Коллекция UNIQEM»)**

«Согласовано»



Руководитель ЦКП «Коллекция UNIQEM»

[Signature] д.б.н. А.Л. Мулюкин

«30» августа 2017

МОСКВА 2017

Разработано

ФИО, степень, должность	Подпись	Подразделение
Груздев Д.С., к.б.н., врио зав. лаб.		лаб. молекулярной диагностики/ЦКП «Биоинженерия»
Колганова Т.В., к.т.н., с.н.с.		лаб. молекулярной диагностики/ЦКП «Биоинженерия»

Идентификацию штаммов микроорганизмов методом секвенирования маркерных последовательностей производят в соответствии со следующими процедурами.

1. Идентификации этим методом подлежат:
 - новые изоляты микроорганизмов, полученные в ходе инициативных исследований в соответствии со «Стандартной операционной процедурой по выделению штаммов микроорганизмов из разнообразных природных источников, в т.ч. экстремальных мест обитания», разработанной для ЦКП «Коллекция UNIQEM»;
 - штаммы микроорганизмов, нуждающихся в уточнении таксономического положения в соответствии с пп. 1 и 3 «Стандартной операционной процедуры по проверке аутентичности коллекционного фонда микроорганизмов», разработанной для ЦКП «Коллекция UNIQEM»;
 - при необходимости - штаммы, для которых применена «Стандартная операционная процедура коррекцию нарушений качества единиц хранения в коллекции UNIQEM».

2. Выращивание культур микроорганизмов, предоставляемых для индентификации, осуществляют в соответствии со «Стандартной операционной процедурой по поддержанию штамма микроорганизма в живых культурах», разработанной для ЦКП «Коллекция UNIQEM».

3. Молекулярная идентификация микроорганизмов проводится в соответствии со Стандартной операционной процедурой ЦКП-БИО ИМ01 «Идентификация микроорганизма на основе сравнительного анализа последовательностей генов рибосомной РНК», разработанной в ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН.

4. ЦКП «Коллекция UNIQEM», сотрудничающие с ним структурные подразделения ФИЦ Биотехнологии РАН, а также внешние пользователи выступают в качестве заказчика услуг ЦКП «Биоинженерия».

5. Анализ образца штамма включает выполнение следующих процедур (в соответствии с вышеобозначенной Стандартной операционной процедурой ЦКП-БИО ИМ01, с небольшими модификациями):

- 5.1. Предоставление образца (партии образцов) выращенных культур микроорганизмов с оформлением сопроводительной таблицы, которая заносится в базу данных в ЦКП «Биоинженерия» с присвоением каждому образцу уникального номера.
 - 5.2. Отбор части образца (аликвоты суспензии клеток микроорганизма) на выделение ДНК с помещением оставшейся части в музей (морозильник). Запись в базе данных о месте хранения биомассы.
 - 5.3. Выделение ДНК с отбором аликвоты на анализ с помещением остатка образца выделенной ДНК в музей (морозильник). Запись в базе данных о месте хранения соответствующего образца ДНК.
 - 5.4. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) с выделенной ДНК для получения фрагментов целевого гена. Секвенирование полученных фрагментов. Занесение полученных файлов чтений (нуклеотидных последовательностей) в базу данных под присвоенным номером образца.
 - 5.5. Сборка merge-последовательности. Занесение файла с информацией о собранной последовательности во внутреннюю базу данных.
 - 5.6. Проведение первичного BLAST-анализа на 10 ближайших последовательностях типовых штаммов. Внесение полученных данных в базу данных.
 - 5.7. Сборка и выравнивание 10 последовательностей ближайших типовых штаммов с последовательностью, полученной для исследуемого штамма (образца). Формирование таблицы сходства.
 - 5.8. Подготовка файла для отчета, утверждение и направление заказчику.
 - 5.9. По запросу заказчика – построение филогенетических деревьев.
6. Требования к образцам микробных культур, направляемых на анализ.
Образцы предоставляют в виде культур клеток, выросших на плотной питательной среде, либо осадка в пробирках типа Эппендорф (в соответствующей среде), полученного центрифигированием клеток, выращенных в жидкой среде. Допустимо предоставление биомассы в жидкой среде в пробирках Хангейта.
7. Порядок действий при выявлении проблем и несоответствий регламентируется Стандартной операционной процедурой ЦКП-БИО ИМ01, разработанной в ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН и приводится ниже.

№№	Описание проблемы/несоответствия	Перечень действий
7.1	ДНК бактериального образца не выделяется с использованием методов Promega, MoBio или СТАВ или выделена не пригодная для ПЦР ДНК-матрица.	<ul style="list-style-type: none"> • Отметить данный факт в электронной базе данных. • Подготовить данные эксперимента по выделению и проверке выделенного образца ДНК на ПЦР-пригодность для обсуждения. • Сообщить зав. лабораторией.
7.2.	Полноразмерный ПЦР-фрагмент не амплифицируется с праймеров Univ11F – Univ 1492R.	<ul style="list-style-type: none"> • Отметить данный факт в электронной базе данных. • Получить перекрывающиеся ПЦР-фрагменты с использованием альтернативных праймеров по Lane. • Сменить ВСЕ реактивы для ПЦР. • Сообщить зав. лабораторией.
7.3	Обнаружены места неоднозначного чтения последовательности нуклеотидов	<ul style="list-style-type: none"> • Отметить данный факт в электронной базе данных, указав файл исходного чтения и позиции неоднозначного чтения. • Сообщить зав. лабораторией. • Связаться с заказчиком и обсудить необходимость применения дополнительных анализов для чтения разных копий целевых генов.
7.4	Обнаружено присутствие двух и более матриц (бинарная или монокультура)	<ul style="list-style-type: none"> • Отметить данный факт в электронной базе данных, указав файл(ы) исходного чтения, содержащие подтверждение наличия множественных матриц. • Прекратить дальнейший анализ данного образца. • Сформировать отчет с указанием факта загрязнения аксеничной культуры нецелевыми микроорганизмами.
7.5	Обнаружено несоответствие таксономической принадлежности изучаемого организма на высшем таксономическом уровне (грибы вместо бактерий, археи вместо эубактерий или наоборот)	<ul style="list-style-type: none"> • Отметить данный факт в электронной базе данных, указав файл(ы) исходного чтения, содержащие подтверждение обнаруженного факта. • Прекратить дальнейший анализ данного образца. • Сообщить зав. лабораторией.
7.6	Выявлен патогенный микроорганизм в исследуемом образце	<ul style="list-style-type: none"> • Немедленно прекратить все анализы с этим материалом. • Биологический материал

		<p>уничтожить сжиганием.</p> <ul style="list-style-type: none">• Сообщить зав. лабораторией.• Немедленно связаться с заказчиком работ и поставить его в известность.• Провести стерилизацию приборов, инструментов и рабочих поверхностей в местах потенциальных загрязнений.
--	--	---