

**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)

_____ чл.-корр. РАН Попов

«15» августа 2017

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО МИКРОСКОПИРОВАНИЮ
КУЛЬТУР И КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ (В ТОМ ЧИСЛЕ, С ПРИМЕНЕНИЕМ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ)
в ЦКП «Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных
физиологических групп биотехнологического назначения (UNIQEM)»
(ЦКП «Коллекция UNIQEM»)**

«Согласовано»


Руководитель ЦКП «Коллекция UNIQEM»

_____ д.б.н. А.Л. Мулюкин

«01» августа 2017

МОСКВА 2017

Разработано

ФИО, степень, должность	Подпись	Подразделение
Менько Е.В. к.б.н., н.с.		Лаборатория выживаемости микроорганизмов

Микроскопические исследования суспензий клеток микроорганизмов методами просмотров в режимах светлое поле, темное поле, фазовый контраст, эпифлуоресценция осуществляют в соответствии со следующими процедурами.

1. Подготовка препаратов:

- 1.1 Используют чистые, обезжиренные и высушенные предметные стекла толщиной не более 1 мм и покровные стекла толщиной не более 0.17 мм.
- 1.2 При просмотрах препаратов с использованием объектива с маркировкой oil используют иммерсионное масло.
- 1.3 Для исследований живых (нефиксированных) клеток на предметное стекло наносят 3-5 мкл клеточной суспензии или культуры и плотно прижимают покровным стеклом. При необходимости на поверхность покровного стекла наносят иммерсионное масло.
- 1.4 Для исследований фиксированных клеток препарат наносят на предметное стекло, высушивают, и поверх высушенного образца наносят каплю иммерсионного масла. Препарат прижимают покровным стеклом.
- 1.5 Для исследований препаратов на мембранных фильтрах их кусочки помещают в каплю иммерсионного масла на предметном стекле, поверх фильтра наносят масло и прижимают покровным стеклом.
- 1.6 Обработку образцов клеток флуоресцентными красителями проводят в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Данная СОП не регламентирует процедуру окрашивания препаратов различными красителями и ограничивается описанием подготовки препарата с использованием популярного красителя.
 - 1.6.1. Пример подготовки препарата красителем Live/Dead для выявления целых и поврежденных клеток бактерий по зеленой и красной эпифлуоресценции, соответственно. Суспензию живых клеток объемом 5 мкл наносят на покровное стекло и смешивают с 5 мкл нанесенного раствора Live/Dead, который готовят и хранят согласно поставляемой инструкции. Смесь накрывают покровным стеклом и инкубируют 15 мин в темноте при 37 °С до начала просмотра. В случае работы с галофильными микроорганизмами, для которых недопустимо разбавление суспензии раствором красителя, подготовку препарата проводят следующим образом: 5 мкл раствора Live/Dead наносят на предметное стекло в определенной точке и высушивают при комнатной температуре в темноте до полного высыхания капли. Суспензию галофильных микроорганизмов объемом

наносят в эту точку, прижимают покровным стеклом и инкубируют 15 мин в темноте перед просмотром.

1.6.2. Подготовку препаратов с прокрашиванием акридиновым оранжевым, DAPI, рiсoGreen и т.д. осуществляют по специально разработанным процедурам.

2. Порядок работы со световым микроскопом AxiolmagerD1 с объективами для просмотров препаратов с увеличением $\times 40$, $\times 63$, $\times 100$ раз.

2. 1. Включение:

2.1.1. Снять защитные колпаки на окулярах и на стекле проходящего света.

2.1.2. Включить микроскоп.

2.1.3. При просмотре в режиме эпифлуоресценции – включить блок питания люминисцентной лампы

2.2. Просмотр препарата в проходящем свете:

2.2.1. Поместить подготовленный препарат на предметный столик микроскопа под прижимными лапками напротив меток.

2.2.2. Выбрать нужный объектив и направить его на препарат, путём вращения револьвера с объективами.

2.2.3. Проверить соответствие выбранного метода микроскопии объективу и сверить маркировки объектива и режима, установленного на колесе предметного столика. Проверить наличие масла (для объективов с маркировкой "oil")

2.2.4. Открыть шторку лампы проходящего света на блоке управления микроскопа.

2.2.5. Переместить препарат под объектив с помощью направляющих ручек.

2.2.6. Сблизить стекло с препаратом и объектив до необходимого расстояния путем подъема предметного столика.

2.2.7. Настроить резкость препарата с помощью микро и макро винта смотря в окуляры

2.3. Просмотр препарата в отраженном свете (для просмотров в режиме эпифлуоресценции):

2.3.1. Включить блок питания люминисцентной лампы. Работу начинать только после окончания обратного отсчета на дисплее блока питания.

2.3.2. Поместить препарат подготовленный в соответствии с п.1.1, 1.2 или 1.3 на предметный столик микроскопа под прижимными лапками напротив меток.

2.3.3. Выбрать нужный объектив и направить его на препарат, путём вращения револьвера.

2.3.4. Проверить соответствие выбранного метода микроскопии объективу и сверить маркировки объектива и режима, установленного на колесе предметного столика. Проверить наличие масла для объективов с маркировкой "oil"

2.3.5. Выбрать фильтр для отраженного света с необходимой длиной волны.

2.3.6. Опустить защитную шторку перед объективом

2.3.7. Открыть шторку лампы отраженного света на блоке управления микроскопа.

2.3.8. Переместить под объектив препарат с помощью направляющих ручек.

2.3.9 Сблизить стекло с препаратом и объектив до необходимого расстояния путем подъема предметного столика .

2.3.10. Настроить резкость препарата смотря в окуляры с помощью микро- и макро винта

2.4. Регистрацию изображений осуществляют в цифровом виде с помощью камеры AxioCam, которые сохраняют в памяти компьютера в формате jpg и передают пользователю в виде копий.

2.5. Окончание работы с микроскопом

2.5.1. Выключить питание люминисцентной лампы.

2.5.2. Выключить питание микроскопа.

2.5.3. Опустить предметный столик и выдвинуть его на себя.

2.5.4. Вынуть препарат из-под лапок столика

2.5.5. Протереть бумажной салфеткой объектив, если использовалось масло.

2.5.6. Накрыть окуляры и стекло проходящего света защитными колпаками.

2.5.7. Накрыть микроскоп чехлом.

2.5.8. Выключить компьютер.

3. Регистрация сеанса

После окончания работ в журнал заносят дату, время сеанса, сведения о препарате, ФИО пользователя и сотрудника, проводившего сеанс микроскопии.