

ФАНО РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Г.Б. ЕЛЯКОВА
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

УТВЕРЖДАЮ

Директор ТИБОХ ДВО РАН,

академик РАН

В.А. Стоник

«21»

2017 г.



Стандартная операционная процедура по идентификации штаммов бактерий и грибов по
морфологическим, физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам в
Коллекции морских микроорганизмов

Владивосток 2017

Бактерии

Макроморфологические признаки

Основными диагностическими культуральными (макроморфологическими) признаками бактерий являются характерные особенности роста на плотных и жидких питательных средах, к которым относятся:

при росте на поверхности агаризованных сред:

размер колонии

форма колоний

поверхность колоний

профиль колоний

наличие блеска и прозрачности колоний

цвет колонии

окраска питательной среды при наличии

строение края и центра колоний

структура колоний

консистенция колоний

Рост в жидких питательных средах проявляется в виде помутнения, образования осадка или пленки. По типу роста характеризуют: степень помутнения, характер осадка, особенности пленки.

Микроморфологические признаки

Морфологические признаки бактерий выявляются при световой микроскопии. Для исследования готовится препарат, для чего на предметное стекло наносят каплю воды, помещают в нее исследуемый материал или каплю культуры, выращенную на жидкой питательной среде. Препарат покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Основными диагностическими микроморфологическими признаками являются:

форма клеток

размер клеток

при наличии спор: форма, диаметр спор, расположение спор в клетке

наличие подвижности клеток

тип жгутикования

наличие включений и их описание

Физиолого-биохимические свойства

Характеристика физиолого-биохимических свойств бактерий при проверке аутентичности культур включает в себя набор тестов, являющихся идентификационными для каждого представителя. К таким тестам относятся:

использование различных соединений углерода

использование соединений азота

использование соединений серы

отношение к молекулярному кислороду

отношение к NaCl

ферментативная активность по отношению к определенным субстратам

потребность в факторах роста

Для характеристики физиолого-биохимических свойств бактерий используются API-системы (Франция).

Грибы

Идентификация микроскопических грибов проводится на основании культурально-морфологических признаков с использованием различных определителей.

Макроморфологические признаки

Основными диагностическими культуральными признаками мицелиальных грибов, выявляемых при изучении внешнего вида колонии являются:

размер колонии

окраска колонии

окраска обратной стороны (реверса) колонии

строение края и центра

характер поверхности

наличие эксудата

наличие и характер запаха

наличие и характер репродуктивных органов

Микроморфологические признаки

Морфологические признаки мицелиальных грибов выявляются при световой микроскопии. Для выявления спороношения культуры производится микроскопия непосредственно на чашке Петри с использованием микроскопов типа МБС-1 (отраженный свет, увеличение от 16х до 50х) или «Эргавал» (Carl Zeiss Jena) (проходящий свет, увеличение от 15х до 400х).

Для дальнейшего исследования готовится препарат, для чего на предметное стекло наносят каплю воды или 0,1% раствора уксусной кислоты, помещают в нее исследуемый материал. Препарат накрывают покровным стеклом, с помощью фильтровальной бумаги удаляют излишки жидкости. Исследование проводят сначала при малом увеличении, затем при большом увеличении. Основными диагностическими морфологическими признаками мицелиальных грибов, выявляемых при микроскопии, являются:

тип конидеобразования

размер и форма конидиальных структур

размер конидий, аскоспор или базидиоспор

форма конидий, аскоспор или базидиоспор

окраска конидий, аскоспор или базидиоспор

поверхность конидий, аскоспор или базидиоспор

количество клеток в конидии, аскоспоре, тип перегородок

Молекулярно-генетические характеристики

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами в «Коллекции морских микроорганизмов» состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

- «Стандартная операционная процедура по контролю чистоты культур»
- «Стандартная операционная процедура по выделению новых штаммов бактерий и грибов в Коллекции морских микроорганизмов»

Идентификация культур молекулярно-биологическими методами по последовательности гена 16S rRNA бактерий состоит из ряда последовательных процедур, включающих в себя выделение геномной ДНК, амплификацию гена 16S rRNA, визуализацию при помощи горизонтального гель-электрофореза, подготовку полученных ампликонов и получению информации о последовательности с использованием программы Sequence Scanner v1.0.

1. Выделение геномной ДНК

С помощью одноразовой стерильной микробиологической петли 5-10 мг микробной культуры переносится в стерильную пробирку на 1.5 мл. Выделение геномной ДНК проводится с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК «GeneJET Gel Extraction Kit» или «MaqJET Plant Genomic DNA Kit» (ThermoScientific), согласно инструкции производителя.

2. Амплификация гена 16S rRNA.

На одну реакцию берется 25 мкл набора для проведения ПЦР «Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)» (ThermoScientific), по 5 мкл 5 μ M раствора прямого и обратного праймера, 3 мкл раствора ДНК, 10 мкл ddH₂O. Пробирки с готовой смесью ставятся в амплификатор «DNA Engine Tetrad 2 peltier Thermal Cycler» (BioRad). Выставляется температура первичной денатурации 95°C на 10 мин., затем основная программа, состоящая из 30 циклов: 94°C – 30 сек, 55°C – 30 сек, 72°C – 1,5 мин. После последнего цикла, образцы выдерживаются при 70°C в течение 7 мин для заполнения выступающих 5 штрих концов ПЦР продуктов комплементарной цепью.

3. Электрофоретический анализ образцов

Визуализация продуктов амплификации проводится методом горизонтального геле-электрофореза в присутствии бромистого этидия. Гель-электрофорез проводится с использованием буферного раствора ТАЕ в 1% агарозном геле. Концентрированный 50х буферный раствор разводится дистиллированной водой из расчета 1 мл на 50 мл до 1х конечного раствора. Для получения 1% - го геля используется 1 гр. агарозы, 75 мл дистиллированной воды и 1,5 мл концентрированного буферного раствора ТАЕ. Периодически перемешивая, смесь нагревается в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Не доводя до кипения, гель вынимается из микроволновой печи и остывает приблизительно до 40-50°C. Далее в него добавляется 1,5 мкл бромистого этидия и заливается в форму. Для образования ячеек вставляются гребешки и гель оставляется на 20-30 минут для полимеризации.

В первую ячейку геля наносится 5 мкл ДНК-маркера «FastRuler™ Middle Range DNA Ladder» (Fermentas), в последующие ячейки каждый из продуктов ПЦР. Электрофорез

проводится при напряжении в 100 В в течении 40 минут. Результат определяется под ультрафиолетом на гель-документирующей системе «VersaDoc XR Sistem» (BioRad).

4. Подготовка образцов для проведения секвенирования.

4.1 Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации проводится с использованием набора для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Cleanup Standart» (Евроген) согласно инструкции производителя.

4.2 Постановка реакции Сенгера.

Для постановки реакции Сэнгера используется коммерческий набор «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems). Подготавливается мастер-микс: 20 мкл воды, 6 мкл Buffer 5x, 1 мкл Big Dye, 1 мкл. Смесь перемешивается на вортексе «Microspin FV-2400» (BIOSAN) и сбрасываются капли. В тонкостенные пробирки мастер-микс аликвотируется по 28 мкл, затем добавляется 2 мкл продукта ПЦР. Образцы перемешиваются на вортексе и сбрасываются капли. На амплификаторе «AB 2720 Thermal Cycler» (BioRad) выставляется программа р.Сенгера: 95°C – 3 мин, 98°C – 8 сек, 54°C – 10 сек, 60°C – 4 мин, 60°C – 10 мин. Хранение - 4°C. Всего 30 циклов.

4.3 Очистка продуктов реакции Сенгера

Пробирки после хранения на -20°C прогрели при 98°C в течении 5мин. В 1.5 мл пробирки добавляется 2 мкл 0.5М ЭДТА, 30 мкл продуктов р.Сенгера и 92 мкл перегнанного этанола. Тщательно перемешивается на вортексе и оставляется на 10 мин при комнатной температуре. Центрифугируется 20 мин при 13200 об/мин на центрифуге «5804R» (Eppendorf). С помощью автоматической пипетки удаляется супернатант. Добавляется 180 мкл 75% этанола. Центрифугируется 3 мин при 13200 об/мин. Удаляется супернатант и образцы сушатся в сушильном шкафу «E 28» (BINDER) при 70°C 10-15 мин.

5. Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей

Определения нуклеотидной последовательности образцов ДНК проводится на секвенаторе «3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems).

Обработка и анализ полученных данных проводится с использованием программного обеспечения Sequence Scanner v1.0. Полученные на автоматическом секвенаторе нуклеотидные последовательности фрагментов 16S рДНК редактируют с помощью программы Mega v. 6.0. Как фрагменты 16S рДНК, так и полные нуклеотидные последовательности 16S рДНК могут сравниваться с имеющимися в базах данных

(GenBank) нуклеотидными последовательностями. Для этого используется программа BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Идентификация культур по последовательности гена 16S rRNA осуществляется с использованием следующего оборудования.

А. Оборудование для выделения геномной ДНК из образцов микробных культур

- боксированное помещение
- горелка спиртовая
- одноразовая стерильная микробиологическая петля
- пробирки объемом 1,5 мл, 0,2 мл
- вортекс MS 3 (IKA)
- дозаторы емкостью 0,5-5 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Thermo Scientific, Ленпипет)
- центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf)
- термостат TDB-120 (BioSan)

В. Оборудование для проведения гель-электрофореза

- основной блок питания «Эльф-8» (ДНК-технология)
- камера для горизонтального гель-электрофореза
- гель-документирующая система VersaDoc XR Sistem(BioRad)

Г. Оборудование для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)

- амплификатор DNA Engine Tetrad 2 peltier Thermal Cyclер (BioRad)
- дозаторы емкостью 0,5-5 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Thermo Scientific, Ленпипет)

Д. Оборудование для очистки продуктов ПЦР

- центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf)
- вортекс MS 3 (IKA)

Е. Оборудование для постановки р.Сенгера

- автоматические пипетки емкостью 1-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл (Eppendorf, Германия),
- амплификатор AB 2720 Thermal Cyclер (BioRad)
- вортексе Microspin FV-2400 (BioSan)

Ж. Оборудование для очистки продуктов р.Сенгера

- вортекс Microspin FV-2400 (BioSan)
- центрифуге 5804R (Eppendorf)

- сушильный шкаф E 28 (BINDER)

3. Оборудование для проведения секвенирования и анализа результатов

- секвенаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

- персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным обеспечением.

Уточнение таксономической принадлежности и филогенетического положения грибов проводится на основе изучения молекулярно-генетических признаков с использованием метода мультилокусного анализа (генов ITS, бета-тубулина и калмодулина) с последующим nBLAST-анализом полученных результатов в базе данных NCBI ([www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Для амплификации генов ITS используются праймеры ITS1 и ITS4, бета-тубулина – праймеры Bt2a и Bt2b, калмодулина – Cmd5 и Cmd6.

Для выделения геномной ДНК 0,5 г клеток культуры гриба разрушают жидким азотом и экстрагируют в 5 мл 4М гуанидина изотиоцианата и разделяют на 2 пробирки. В каждую пробирку добавляют равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, перемешивают, центрифугируют 10 мин при 13000 об/мин. К водной фазе добавляют 1/10 объема 3М ацетата натрия (рН 5.2) и равный объем изопропанола (для осаждения). Осадок ДНК собирают центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин, несколько раз промывают 70%-ным этанолом, затем один раз 96%-ным этанолом (чтобы быстрее высушить), высушивают при комнатной температуре, либо в термостате при 37 °С, и растворяют в 500-1000 мкл бидистиллированной воды.

Куратор КММ чл.-корр. РАН Михайлов В.В.

