



| | | |
|--------------------------------------|-----------------|--|
| ННЦМБ ДВО РАН | СОП № | |
| | Версия | |
| Биоресурсный центр "Морской Биобанк" | Заменяет | |
| | Действительно с | |

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА

НАЗВАНИЕ: Выделение культур динофлагеллят из морских осадков

Разработчики

| | ФИО | Должность | Подпись |
|------------|---------------|--|---|
| Подготовил | Морозова Т.В. | научный сотрудник |  |
| Утвердил | Орлова Т.Ю. | Зам. директора ННЦМБ ДВО РАН по научной работе |  |

I Цель и сфера применения

Стандартизация процессов выделения культур динофлагеллят из морских осадков

Настоящая операционная процедура разработана для сотрудников ННЦМБ ДВО РАН.

II Безопасность

При работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами. При попадании образцов на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды. Ключевой мерой предосторожности во время работы с набором является соблюдение требований «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г., и ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», утвержденного Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г.

III Оборудование и материалы на 1 образец

| | Наименование | Количество | Примечания |
|----|---|------------|-----------------------------------|
| 1. | Биноккулярный инвентированный микроскоп | 1 шт. | |
| 2. | Ультразвуковая установка «Branson | 1 шт. | Производитель: Branson Ultrasonic |

| | | |
|--------------------------------------|-----------------|--|
| НИЦМБ ДВО РАН | СОП № | |
| | Версия | |
| Биоресурсный центр "Морской Биобанк" | Заменяет | |
| | Действительно с | |

| | | | |
|-----|--|-------------------|--|
| | Sonifer 450» | | Corp., USA |
| 3. | Климатический шкаф | 1 шт. | Производитель: Binder |
| 4. | Ламинарный бокс | 1 шт. | Модель – SafeFAST Elite-S/D Инв №1013400141 |
| 5. | Автоматическая пипетка-дозатор 100-1000 мкл | 1 шт. | Автоматический одноканальный дозатор ResearchPlus переменного объема (100-1000 мкл). Производитель – Biohit |
| 6. | Пипеточный дозатор электрический | 1 шт. | Дозатор "Э-Пипет" 0,1-100 мл |
| 7. | Наконечники объемом 1000 мкл (1000µl) | 10 | Наконечники, стерильные, до 1000 мкл, бесцветные. |
| 8. | Наконечники объемом 5000 мкл (5000µl) | 2 | Наконечники, стерильные, до 5000 мкл, бесцветные. |
| 9. | Среда для культивирования f/2 | Не менее 2.5 л | |
| 10. | Морская вода | 2.1 л | Фильтрованная |
| 11. | Сито для промывания осадков | 2 шт | Капроновые либо металлические сита с диаметром ячеек 20 мкм и 80 мкм |
| 12. | Промывалка | 1 шт | Производитель: TermoFisher , объем 500 мм |
| 13. | Стекланный стакан | 2 шт | Стерильный, объем не менее 1л |
| 14. | Пластиковый стакан | 1 шт | Стерильный, объем 50 мл |
| 15. | Пластиковая воронка | 1 шт | Стерильная, диаметр 50 мм |
| 16. | Пластиковые одноразовые чайные ложки | 1 шт | Стерильные |
| 17. | Фалькон пластиковый, с закручивающейся крышкой на 15 мл | 1 шт. | Стерильный |
| 18. | Чашка Петри | 1 шт | Стерильные, диаметр 30-70 мм |
| 19. | Капиллярная пипетка | 250 шт. | Стерильная |
| 20. | Предметное стекло | 2 шт | Стерильное |
| 21. | Планшет для клеточных культур на 96 ячеек | 1 шт | Стерильный |
| 22. | Планшет для клеточных культур на 6 ячеек | 8 шт. | Стерильные |
| 23. | Матрасик | Не менее 50 шт | Стерильные |
| 24. | Перчатки одноразовые неопудренные медицинские | 1 пара | |
| 25. | Медицинский халат | 1 шт. | |
| 26. | Этанол | 100 мл | 96 % спирт |
| 27. | Спиртовка | 1 шт. | |
| 28. | Изоляционная лента | 1 шт. | |
| 29. | Маркер | | |

| | | |
|--------------------------------------|-----------------|--|
| НИЦМБ ДВО РАН | СОП № | |
| | Версия | |
| Биоресурсный центр "Морской Биобанк" | Заменяет | |
| | Действительно с | |

IV Общие положения

1. Работы по культивированию проводят в лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 15150-69.
2. Морские осадки, отобранные с целью выделения из них культур динофлагеллят, маркируют и хранят в плотно закрытых контейнерах, в темном месте при температуре 4°C, не допуская их высыхания.
3. Для проведения работ по выделению микроводорослей в культуру необходимо предварительно подготовить стерильную посуду, фильтрованную морскую воду, среду для культивирования f/2, провести асептическую обработку рук и рабочих поверхностей, установить необходимую температуру и освещение в климатическом шкафу.
4. Всю информацию, касающуюся выделения цист, переноса клеток, пересевов и мониторинга культур вносить в журнал наблюдений.

V Описание

1. Подготовка проб морских осадков для выделения микроводорослей.
 - 1.1. 1-2 мл пробы осадков поместить в пластиковый стакан объемом 50 мл и добавить 15-30 мл фильтрованной морской воды.
 - 1.2. Обработать полученный раствор осадков на ультразвуковой установке в течение 1 мин при силе электрического тока 4 А.
 - 1.3. Полученную суспензию осадка промыть через сито с диаметром ячеек 80 мкм с помощью промывалки над стаканом объемом 1 л. Для этой цели использовать не менее 1 л фильтрованной морской воды.
 - 1.4. Полученную промытую суспензию осадка снова промыть через сито с диаметром ячеек 20 мкм. Для этой цели использовать не менее 1 л фильтрованной морской воды.
 - 1.5. Полученную фракцию осадка размером 20-80 мкм смыть с сита через воронку в фалькон объемом на 15 мл.
2. Выделение микроводорослей в культуру.
 - 2.1. Заполнить лунки 96-луночного планшета для культивирования средой f/2, 250 мкл в каждую лунку. Закрыть планшет крышкой до тех пор пока он не потребуется.
 - 2.2. Поместить несколько мл промытого осадка в чашку Петри.
 - 2.3. Найти в чашке Петри под микроскопом клетку (цисту) динофлагелляты.
 - 2.4. Отловить клетку микрокапилляром и поместить ее в каплю стерильной морской воды на отдельном предметном стекле.
 - 2.5. Найти клетку в капле и перенести ее в другую каплю стерильной морской воды с помощью нового чистого микрокапилляра.
 - 2.6. Повторить пункт 2.4. до тех пор пока в капле не будет посторонних примесей, но не менее трех раз.

| | | |
|--------------------------------------|-----------------|--|
| НИЦМБ ДВО РАН | СОП № | |
| | Версия | |
| Биоресурсный центр "Морской Биобанк" | Заменяет | |
| | Действительно с | |

- 2.7. Отмытую цисту при помощи нового микрокапилляра поместить в отдельную лунку 96-луночного планшета для культивирования, содержащего 2500 мкл среды f/2.
- 2.8. Повторить пункты 2.3.-2.7. не менее 50 раз (для каждого вида микроводорослей).
Внимание: в каждой лунке должно быть не более одной цисты.
- 2.9. По окончании процедуры отлова планшет для культивирования заклеить по периметру изоляционной лентой, чтобы избежать испарения питательной среды из лунок, содержащих цисты, и промаркировать.
- 2.10. Планшет поместить в климатический шкаф с нужной температурой и режимом освещения.
3. Ежедневно проводить мониторинг изолированных клеток (цист) под инвентированным микроскопом. При обнаружении проросших цист внести информацию в журнал наблюдений.
4. Получение накопительной культуры.
 - 4.1. Заполнить лунки 6-луночного планшета для культивирования средой f/2, 5 мл в каждую лунку. Закрыть планшет крышкой до тех пор пока он не потребуется.
 - 4.2. При увеличении количества подвижных клеток в лунке 96-луночного планшета до 3-5 в поле зрения перенести все содержимое лунки в лунки 6-луночного планшета содержащего 5 мл среды f/2. Перенос осуществлять в ламинарном боксе прошедшем асептическую обработку вблизи зажженной спиртовки. Переносу подлежит содержимое только тех лунок, где не обнаружено посторонних микроорганизмов. Содержимое каждой лунки переносится в отдельную большую лунку.
 - 4.3. По окончании процедуры переноса планшеты для культивирования заклеить по периметру изоляционной лентой, чтобы избежать испарения питательной среды из лунок, содержащих цисты, и промаркировать.
 - 4.4. Поместить планшеты в климатический шкаф с нужной температурой и режимом освещения.
 - 4.5. Проводить мониторинг изолированных клеток (цист) под инвентированным микроскопом через три дня и далее ежедневно.
 - 4.6. При увеличении количества подвижных клеток в лунке 6-луночного планшета до 3-5 в поле зрения перенести все содержимое лунки в матрасик, содержащий 30 мл среды f/2. Перенос осуществлять в ламинарном боксе прошедшем асептическую обработку вблизи зажженной спиртовки. Переносу подлежит содержимое только тех лунок, где не обнаружено посторонних микроорганизмов. Содержимое каждой лунки переносится в отдельный матрасик.
 - 4.7. Матрасики промаркировать и поместить планшеты в климатический шкаф с нужной температурой и режимом освещения.
 - 4.8. Проводить мониторинг культур в матрасиках еженедельно.

| | | |
|--------------------------------------|-----------------|--|
| НИЦМБ ДВО РАН | СОП № | |
| | Версия | |
| Биоресурсный центр "Морской Биобанк" | Заменяет | |
| | Действительно с | |

4.9. При необходимости длительного поддержания культуры осуществлять пересев культуры на стадии экспоненциального роста (в среднем один раз в 3 недели). При пересеве перенести 1.5 мл культуры в матрасик с 40 мл среды f/2.

VI Затраченное время

| | Процедура | Время, ч | Примечания |
|---|---------------------------------|-----------------|---|
| 1 | Инвертированный микроскоп | Не менее 42 | Время включает в себя отлов не менее 50 клеток (цист) и дальнейший мониторинг в планшетах и матрасиках. |
| 2 | Работа ламинарного бокса | Не менее 3.5 | время включает предварительную работу УФ лампы, обработку рабочих поверхностей, заполнение средой f/2 лунок планшета и матрасиков и перенос клеток из 96-луночного планшета в 6-луночный планшет и из планшета в матрасик |
| 3 | Работа ультразвуковой установки | 0.02 | |
| 4 | Работа климатического шкафа | 1464 | |
| 5 | Человеко-часы | Не менее 46 | |