



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

**Ботанический
институт**
им. В. Л. Комарова
Российской академии наук

От «27» декабря 2021 г.

№ 153 - ОД

г. Санкт-Петербург

П Р И К А З

/Об утверждении и введении в действие «Технологического паспорта хранилища ДНК Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук»/

В соответствии с реализацией проекта «Гербарные фонды биологического разнообразия растений и грибов Коллекционного фонда Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН: модернизация, развитие и сетевое взаимодействие как основа фундаментальных исследований и совершенствования генетических технологий» в рамках «Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации» с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1056 от 28 сентября 2021 года (далее — Соглашение) и п. 4 приказа № 151-ОД от 27 декабря 2021 года БИН РАН

ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить и ввести в действие с 27 декабря 2021 года прилагаемый «Технологический паспорт хранилища образцов ДНК Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук»
2. Контроль за выполнением приказа оставляю за собой.

Директор БИН РАН

Д.В. Гельтман

Утверждено и введено в действие
Приказом директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук

от 27 декабря 2021 года № 153 - ОД

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ ХРАНИЛИЩА ДНК
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ БОТАНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА ИМ. В. Л. КОМАРОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

1. Общие положения

- 1.1. Специализированное хранилище ДНК растений, грибов, лишайников и водорослей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (далее – Хранилище ДНК) является частью Коллекционного фонда Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (Далее - БИН РАН).
- 1.2. Хранилище ДНК содержит образцы, выделенные из живых или гербарных образцов и предназначено для их длительного сохранения.
- 1.3. Хранилище ДНК служит основой эффективного использования образцов ДНК для научных исследований и позволяет быстро и легко идентифицировать любой отдельный образец в рабочем процессе.
- 1.4. С целью ускорения, оптимизации и облегчения работы с образцами ДНК используются двумерные штрихкоды, размещаемые на пробирках.
- 1.5. Если ожидается, что конкретный образец ДНК будет использоваться в нескольких исследованиях, предполагается создание аликвот этого образца, которые будут размораживаться только в случае, когда в этом возникнет необходимость. Это, например, планируется в отношении образцов ДНК, выделенных из типовых гербарных образцов.
- 1.6. При внедрении электронной системы управления образцами данные из всех образцов должны легко накапливаться и заноситься в базу данных. Эта база данных должна давать возможность автоматически отслеживать хранящиеся образцы, чтобы пользователи могли получать информацию об истечении срока годности образцов (например, по дате получения и размещения образцов в хранилище), а также сохранять информацию о датах и количестве циклов размораживания-замораживания образца при его использовании и хранении.

1.7. Сохраненные данные об образце включают такие параметры, как объем образца, источник образца ДНК (вид, ваучерный гербарный образец, образец из живой коллекции (оранжереи), метод выделения ДНК и другие при необходимости. Это дает возможность пользователю правильно идентифицировать образец до получения доступа к нему, что гарантирует отсутствие ошибочной идентификации.

1.7. Режим эксплуатации хранилища, а также последовательность операций при внесении образцов ДНК в хранилище отражены в виде стандартных операционных процедур (СОПов).

2. Технические характеристики хранилища образцов ДНК

2.1. Хранилище ДНК создается на основе Коллекционного фонда БИН РАН, а также с использованием образцов, предоставляемых для изучения другими российскими и зарубежными коллекционными фондами и исследователями. Хранилище размещается на базе лаборатории биохимии грибов и лаборатории систематики и географии грибов.

2.2. Боксы для размещения пробирок с образцами ДНК хранятся в морозильных камерах при температуре $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. В случае аварийного отключения электричества с целью предотвращения размораживания камер предусмотрено автономное энергоснабжение с помощью бензинового электрогенератора с подключенной системой оповещения ответственных пользователей об аварийной ситуации.

2.4. Образцы ДНК хранятся в криопробирках объемом 0,5–2 мл с завинчивающимися крышками, например, 0,75 мл 2D Data-Matrix с завинчивающейся крышкой и внешней резьбой V-образное дно с серой завинчивающейся крышкой в стойке Micronic 96-2 с высокой крышкой (сторона со штрих-кодом A1-H1), (Ziath Ltd., Великобритания). Дизайн и материал исполнения обеспечивает необходимую защиту от контаминации, механическую устойчивость и эргономику.

2.5. Использование бумажных этикеток или маркера может привести к тому, что надпись станет неразборчивой или полностью будет потеряна. В связи с этим используются пластиковые этикетки, поскольку они более прочные, водонепроницаемые и устойчивые к воздействию конденсата при размораживании. В качестве альтернативы используются криопробирки, где штрихкод наносится ультразвуковой сваркой или встраивается в пробирку в процессе формовки. Благодаря качественным штрихкодам реализуются уникальные преимущества автоматизированных систем: меньшие затраты, выше производительность, и сокращение ошибок.

2.6. Для оптимизации хранения образцов в морозильных установках пробирки размещают в штативах или в специальных криобоксах и органайзерах для хранения образцов по 48, 81 или 100 шт.

2.7. Попытка извлечь одну пробирку из штатива может быть сложной задачей, а ручная работа может привести к ошибкам позиционирования пробирки. Для манипуляций с пробирками используются специализированные системы отбора пробирок (пикеры), ручные, например, Microtube Tube Picker (SBS), ZPIK-01, или полуавтоматические, например, Mohawk Tube Picker, ZTS-МНК (Ziath Ltd., Великобритания). Используя программное обеспечение, Mohawk может поднимать одну, две или до шестнадцати отдельных пробирок одновременно, что позволяет легко извлечь их из штатива, например,

MP52757-Y20 и поместить в дополнительный штатив или другое устройство для размещения пробирок.

2.8. С целью управления хранилищем и коллекцией образцов ДНК используются высокоскоростные сканеры, например, фирмы Ziath Ltd., такие как DataPac Cube Single Rack, DataPac Mirage или другие с покрытием, например, Cryoprotection, которое помогает устранить возможность образования конденсата и обеспечивают непрерывность сканирования.

2.9. Для организации управления образцами, включая сканирование и декодирование штрихкодов, а также хранения и использования информации, применяется специализированное программное обеспечение, например, Samples фирмы Ziath Ltd.

3. Стандартные операционные процедуры (СОПы)

Работы по созданию, поддержанию, развитию и использованию хранилища ДНК осуществляются в соответствии со следующими стандартными операционными процедурами (СОПами).

3.1. Стандартная операционная процедура № 1. Подготовка образцов ДНК для длительного хранения

Цель внедрения: стандартизация операций по приему и первичной обработке образцов ДНК для длительного хранения. Результат выполнения: поступающий на хранение образец ДНК оказывается размещенным в криопробирке, хранящейся в специализированном криобоксе в морозильной камере при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ответственность:

— ответственным лицом по организации работы в хранилище ДНК в соответствии с требованиями СОП является специально назначенный сотрудник БИН РАН, имеющий соответствующую подготовку.

— ответственным лицом по приему и первичной обработке образца ДНК является сотрудник, получивший образец ДНК для длительного хранения, имеющий соответствующую подготовку и допуск к работе в хранилище ДНК.

Основные операции:

Проверка образцов ДНК в отношении качества и количества ДНК. Ключевыми показателями качества образца ДНК являются оценка присутствия ингибиторов, чистота образца, двухцепочечность, целостность.

а) Наличие ингибиторов проверяется, чтобы убедиться, что образец пригоден для применения в ПЦР. Для этого проводятся анализ SPUD qPCR (SPUD Assay for Detection of Assay Inhibitors Protocol) или электрофорез ПЦР-фрагментов, полученных с выделенной ДНК. При электрофорезе должен присутствовать отрицательный контроль (ПЦР с деионизированной водой вместо матрицы) и маркер длин.

б) Проводится оценка чистоты образца ДНК с помощью спектрофотометра. ДНК имеет максимальное поглощение приблизительно при 260 нм, а белки – при ~ 280 нм. Загрязняющие вещества, такие как ЭДТА, углеводы и фенол, имеют максимальное поглощение при длине волны ~ 230 нм. Следовательно, соотношения поглощения A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} показывают степень чистоты НК. Образец ДНК считается чистым, если соотношение A_{260}/A_{280} составляет от 1,8 до 2,0, а соотношение $A_{260}/A_{230} > 2,0$. Вместе с тем, образец ДНК с более низким отношением A_{260}/A_{230} ($1,7 \leq A_{260}/A_{230}$

- <2,0) также считается пригодным для использования в молекулярно-биологических исследованиях. Концентрация ДНК (мкг/мл) рассчитывается как $50 \times OD_{260}$ образца.
- в) Флуориметрическое измерение общего количества ДНК, например, на Qubit (Thermo Fisher Scientific). Очень желательно, чтобы ДНК было не менее 10 нг и это значение не отличалось более чем на 20% от количества, определенного при A260 на спектрофотометре.
- г) Проверка двухцепочечности ДНК в образце проводится с помощью спектрофлуориметрии. Если >70% молекул ДНК образца являются двухцепочечными, то образец надлежащего качества.
- д) Показатель целостности ДНК (DNA integrity number, DIN) определяется с помощью микрофлюидного электрофореза, например, на приборе TapeStation Instrument 4150. Если значение DIN >7, то ДНК хорошего качества. Целостность ДНК также можно определить с помощью гель-электрофореза: если все полосы >30 тыс. п.о., это означает, что образец ДНК не подвергся деградации.
- е) Параметры, перечисленные в пунктах «в»-«д» определяются, но не являются показателями научной ценности образца. Целостность ДНК может быть нарушена в особо ценных и уникальных гербарных образцах, особенно старых. Эта фрагментированная ДНК может быть использована, в частности, в экспериментах с NGS. Поэтому в хранилище могут быть включены образцы ДНК со сниженными показателями качества, если они выделены из редких, уникальных экземпляров.

3.2. Стандартная операционная процедура № 2. Размещение образцов в морозильной камере.

Цель внедрения: стандартизация операций по размещению образцов.

Результат: размещение образцов ДНК в специализированных криопробирках и криобоксах (штативах).

Ответственность:

— ответственным лицом по приему и первичной обработке образца ДНК является подготовленный сотрудник, получивший образец ДНК для длительного хранения, или технический персонал.

Основные операции:

- а) Сохранение штрихкода для получения уникального идентификатора образца ID и всей сопутствующей о нем информации в соответствующей электронной базе данных под управлением специализированного программного обеспечения, например, Samples фирмы Ziateh Ltd.
- б) Помещение образца ДНК в криопробирку объемом 0,5–2 мл с завинчивающейся крышкой и двумерным штрихкодом.
- в) Размещение пробирки в криобоксе и помещение его в морозильную камеру.

3.3. Стандартная операционная процедура № 3. Использование замороженного образца ДНК для исследования.

Цель внедрения: стандартизация операций по отбору образцов ДНК из морозильной камеры и проверки их пригодности для исследования.

Результат: получение ДНК из замороженных образцов.

Ответственность:

— ответственным лицом по организации работы в хранилище ДНК в соответствии с требованиями СОП являются заведующие структурными подразделениями, на базе которых создано хранилище ДНК.

— ответственным лицом за выдачу образца ДНК является подготовленный сотрудник, получивший образец ДНК для длительного хранения или технический персонал.

Основные процедуры:

а) Выбор образца по его ID из базы данных под контролем специализированного программного обеспечения.

б) Изъятие замороженного образца с использованием специальных перчаток и специализированных устройств для отбора образцов, например, полуавтоматического селектора пробирок Mohawk.

в) Возвращение образца в морозильную камеру после использования, производится в соответствии с СОП 2.