

15. Стандартная операционная процедура по верификации/ характеристике культур базидиомицетов методом секвенирования последовательностей ITS1-5S-ITS2 участка nrDNA состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих стандартных операционных процедур:

— Стандартная операционная процедура по приготовлению питательных сред и стерильной посуды (Приложение 2);

— Стандартная операционная процедура по пересеву культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 4);

— Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 5);

— Стандартная операционная процедура по контролю чистоты (аутентичности) культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 6);

— Стандартная операционная процедура по ведению документации Коллекции культур базидиомицетов БИН РАН (Приложение 16);

15.1. Для проведения молекулярных исследований штаммы выращивают на лабораторной среде сусло-агар (4% и 2%, соответственно) или на жидкой среде (мальц-экстракт, 15 г/л или картофельно-декстрозный бульон, 20 г/л) в баночках из-под детского питания «baby jars» (30 мл среды) в течение 30-45 дней, в зависимости от скорости роста культур и накопления биомассы.

15.2. С агаризованной среды (из чашки Петри) воздушный мицелий аккуратно снимают скальпелем, стараясь полностью отделять его от агара. При наличии обильного воздушного мицелия достаточно снять мицелий лишь с части колонии.

15.3. Приблизительно 250-300 мг сырого мицелия помещают в микроцентрифужную пробирку эппендорф и используют для выделения ДНК.

15.4. Экстракция ДНК из культурального мицелия проводится с использованием наборов универсальных китов (AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit; NucleoSpin Plant II и т.п.), в соответствии с пошаговой инструкцией, прилагаемой к набору.

15.5. Для амплификации ITS-участка используют 1-3 мкл ДНК, супермикс iQ Super Mix (Bio-Rad) и стандартную пару праймеров для базидиомицетов: ITS1F-ITS4b (в некоторых случаях, ITS1F-ITS4).

15.6. ПЦР амплификацию проводят по программе, подобранной в БИН РАН.

15.7. Для контроля прохождения ПЦР продуктов используют электрофорез и аппаратно-программный комплекс, производящий запись и компьютерную обработку изображений гелей.

15.8. Очистку полученных ПЦР продуктов проводят с использованием универсальных китов (AxyPrep PCR Cleanup Kit, GeneJET PCR Purification Kit и т.п.).

15.9. Дальнейшую пробоподготовку и секвенирование проводят в ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

15.10. Для анализа нуклеотидных последовательностей используют программу MEGA в последней модификации.

15.11. Информацию о результатах секвенирования заносят в базу данных Коллекции LEVIN, руководствуясь соответствующим СОП (Приложение 16).

15.12. Полученные сиквенсы депонируют в международной информационной базе NCBI GenBank.

При проведении молекулярных исследований используют следующее оборудование: ламинарные шкафы ВЛ-12, паровой стерилизатор (автоклав) ГК-100, термостаты ТС-1/80, термоциклер серии С1000 Touch (Bio-Rad Laboratories), центрифуги настольные (5418, Eppendorf, Германия, ускорение до 16800g), систему гель-документации (GelDoc XR (BioRad laboratories Inc., USA)), оборудование ЦКП БИН РАН: анализатор последовательности нуклеиновых кислот ABI 3130 (Applied Biosystems, USA); оргтехнику (PC с ОС Windows, принтеры, сканеры и пр.) с соответствующим программным обеспечением (MEGA 5.2 и выше) и расходные материалы: комплекты инструментов для работы в ламинаре, наборы микропипеток, стерильные пластиковые чашки Петри, эппендорфа, штативы, реактивы для приготовления сред, спирт и т.д.

Зав. лабораторией биохимии грибов БИН РАН,
Куратор Коллекции LE-BIN

Н.В. Псурцева