

ПРИЛОЖЕНИЕ 8.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. В.Л. КОМАРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

УТВЕРЖДАЮ
Директор БИН РАН,



Д.В. Гельтман
29 августа 2017 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ПОДГОТОВКЕ И
ПРОВЕДЕНИЮ КРИОКОНСЕРВАЦИИ КУЛЬТУР БАЗИДИОМИЦЕТОВ
КОЛЛЕКЦИИ БИН РАН**

(Разработано Н.В. Псурцевой и Н.С. Яковлевой)

Санкт-Петербург 2017

8. Сохранение культур базидиомицетов коллекции LE-VIN методом криоконсервации при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с использованием низкотемпературной морозильной камеры (New Brunswick Scientific U-410) состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих стандартных операционных процедур:

— Стандартная операционная процедура по введению (депонированию) штаммов в фонд коллекции культур базидиомицетов БИН РАН (Приложение 1);

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

— Стандартная операционная процедура по поддержанию фонда коллекции культур базидиомицетов БИН РАН (Приложение 3);

— 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);

8.1. Хранение штаммов методом криоконсервации является одним из трех обязательных методов сохранения культур коллекционного фонда LE-VIN.

8.2. Для применения этого метода хранения нужны прямостоячие пластиковые стерильные криопробирки Западного производства (Германия, Испания и т.д.) на 1.8-2.0 мл с юбкой, наружной резьбой и герметично завинчивающимися крышками; стерильные пластиковые Пастеровские пипетки (или шприцы); предварительно простерилизованный 10% водный раствор глицерина.

8.3. Культуру гриба предварительно выращивают в чашке Петри диаметром 60 мм на среде сусло-агар с 5% агаром и проверяют на аутентичность (Приложения 4 и 6).

8.4. Для криоконсервации используют свежевращенные штаммы.

8.5. Работу по криоконсервации штаммов проводят в ламинарном шкафу или боксе в стерильных условиях.

8.6. Бокс и инструменты предварительно стерилизуют под действием УФ в течение 40 мин.

8.7. С соблюдением стерильности раствор глицерина разливают по криопробиркам стерильной Пастеровской пипеткой или стерильным шприцем, заполняя пробирку примерно на $2/3$ объема.

8.8. Дырокол диаметром 6 мм тщательно обжигают в пламени спиртовке и остужают в спирте. Обжигают спирт над спиртовкой и охлаждают инструмент в агаре у края чашки Петри. На поверхности мицелия дыроколом делают 8 высечек на всю глубину агара. Полученные диски с мицелием и агаром по одному тонким скальпелем переносят по очереди в 2 криопробирки (по 4 штуки в каждую), быстро проводят горлышко пробирки над пламенем и плотно завинчивают крышку.

8.9. Заполненные криопробирки оставляют при комнатной температуре на сутки для набухания дисков в криопротекторе.

8.10. Через сутки криопробирки переносят в штатив из пенопласта и помещают на сутки в морозильник на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для предварительного замораживания со скоростью (0,4-1 град./мин.).

8.11. Через 24 часа пенопластовый штатив переносят в низкотемпературный морозильник на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.12. В последствии, для дальнейшего хранения, замороженные криопробирки с культурами переносят из пенопластового штатива в пластиковый криоштатив и помещают на постоянное место хранения.

8.13. Криоконсервацию осуществляют при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Приложение 3).

8.14. Пересев культур, хранящихся методом криоконсервации осуществляют согласно соответствующему СОПу (Приложение 4).

8.15. Все пробирки должны быть подписаны соответствующим образом, а номера контейнера и ячейки занесены в базу данных (Приложение 16).

Криоконсервация коллекционных культур осуществляется с использованием следующего лабораторного оборудования: ламинарные шкафы ВЛ-12, лабораторный бокс, паровой стерилизатор (автоклав) ГК-100, термостаты ТС-1/80 и хладотермостаты ТСО-1/80, низкотемпературный холодильник (New Brunswick Scientific U-410, микроскопическая техника (световой микроскоп AxioScope A1, Carl Zeiss, стереомикроскопы МБС-10 и МС-2), холодильники, вытяжные шкафы и т.д.; и расходных материалов: комплекты инструментов для работы в ламинаре, наборы микропипеток, стерильные пластиковые чашки Петри, стерильные криопробирки европейских производителей, стерильные пластиковые пастеровские пипетки, реактивы для приготовления сред, спирт и т.д.

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



Н.В. Псурцева