

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.	Бинокулярный 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.	Стеклянный 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		

ННЦМБ 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	