

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИЭГМ УрО РАН,
Д.м.н. профессор, чл.-корр. РАН
Демаков В.А.



«12» января 2017 г.

Стандартная операционная процедура по проверке качества (аутентичности)
поддерживаемого фонда алканотрофных актинобактерий
Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов
(официальный акроним коллекции ИЭГМ)

Составитель: д.б.н. Куюкина М.С.
Дата обновления: «12» января 2017 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Руководитель Региональной профилированной
коллекции алканотрофных микроорганизмов,
зав. лаб. алканотрофных микроорганизмов,
д.б.н., профессор, академик РАН

Ившина И.Б.
«12» января 2017 г.

Наименование исследования. Оценка аутентичности чистых культур алканотрофных актинобактерий (соответствия ее паспортным данным и видовым свойствам) путем реидентификации на основании морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических признаков.

Назначение. Экспертиза аутентичности коллекционных штаммов проводится систематически (через определенные промежутки времени в зависимости от вида микроорганизма) в процессе их длительного хранения различными методами и параллельно с проверкой жизнеспособности и чистоты культур. Основные направления организации контроля качества: (1) контроль за соблюдением требований к условиям проведения микробиологических исследований: (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т.д.); (2) выполнение регламентированных процедур ведения коллекционных бактериальных культур; (3) контроль качества питательных сред; (4) систематический анализ результатов контрольных процедур в целях совершенствования СОП по качеству.

Последовательность действий по экспертизе аутентичности: лиофилизированная (криоконсервированная) культура тест-штамма – восстановление культуры – контроль качества: проверка на чистоту роста и отсутствие диссоциации, проверка основных свойств культуры, подтверждающих их подлинность, согласно Паспорту. В случае обнаружения более 25 % полиморфных колоний и/или несоответствия паспортным свойствам – культура не может быть использована в работе.

Этап 1. Восстановление лиофилизированной культуры: оттянутый конец ампулы с лиофилизированной культурой нагревают над пламенем горелки, влажным концом стерильного ватного тампона прикасаются к нагретой части, в результате чего появляются трещины. Конец ампулы накрывают трехслойной марлевой салфеткой, смоченной 70° этиловым спиртом и хорошо отжатой и обламывают пинцетом. После вскрытия ампула остается накрытой той же салфеткой в течение 1–2 мин. Затем салфетку осторожно снимают и вместе с остатками стекла погружают в дезраствор. В ампулу вносят к 0,3 мл питательного бульона для регидратации. Содержимое ампулы перемешивают, переносят стерильной пастеровской пипеткой или шприцем в пробирку с питательным бульоном и инкубируют при 30 °С в течение 48–72 ч. Оставшуюся бульонную культуру используют для оценки степени диссоциации тестируемого штамма. После инкубации из питательного бульона делают высеv петлей на скошенный питательный агар в две пробирки. При восстановлении штамма посев осуществляется на скошенный питательный агар. Посевы инкубируют при 30 °С 48–72 ч. Одну пробирку с посевом используют для постановки тестов на соответствие полученного штамма видовым и паспортным свойствам. Второй посев на скошенном питательном агаре используют для создания запасов рабочей культуры. Культура с измененными свойствами в работу не допускается.

Восстановление криоконсервированной культуры: деконсервацию клеток осуществляют путем отогрева криопробирки на водяной бане при температуре 30 °С. Из криопробирки с суспензией клеток в растворе криопротектора отбирают аликвоту 100 мкл и производят посев в жидкую питательную среду или на соответствующую питательную среду в чашки Петри. Культивирование бактериальных клеток осуществляют при 28 °С. Посевы инкубируют при 28 °С 48–72 ч.

1.1. Создание запасов рабочей культуры. При удовлетворительном прохождении контрольных тестов культуру со скошенного питательного агара засевают уколом в столбик с полужидким агаром. В зависимости от интенсивности работы лаборатории посевы проводят в 4–7 пробирок, из расчета по 1–2 пробирки на 1 месяц работы и в 1 пробирку для восполнения запасов рабочей культуры через три месяца на следующий квартал. Посевы инкубируют 72 ч при 30 °С. При наличии роста пробирки закрывают 48–72 ч резиновыми пробками и закладывают на хранение при температуре 4–8 °С. Одну из пробирок с культурой, предназначенной для восполнения рабочих запасов, маркируют и хранят отдельно. Запасы рабочей культуры желательно хранить в отдельном холодильнике.

1.2. Восполнение запасов рабочей культуры. Восполнение запасов рабочей культуры производится в конце третьего, шестого и девятого месяца с момента вскрытия ампулы (каждые 3 месяца). Для восполнения запасов рабочей культуры используется субкультура на среде хранения, полученная ранее при создании запасов или при очередном их восполнении. Из пробирки с культурой, предназначенной для восполнения запасов, производят посев в питательный бульон. Посевы инкубируют при 30 °С в течение 48–72 ч. Оставшуюся бульонную культуру используют для оценки степени диссоциации. После инкубации из питательного бульона делают высев петлей в две пробирки со скошенным питательным агаром. Посевы инкубируют при 30 °С 48–72 ч. Один из посевов используют для постановки тестов на соответствие полученного штамма видовым, паспортным свойствам. Второй посев на скошенном питательном агаре используют для восполнения запасов рабочей культуры. При удовлетворительном прохождении контрольных тестов процедура закладки культуры на хранение осуществляется согласно п. 1.1. Восполнение запасов рабочей культуры проводят только 3 раза. По истечении года необходимо получить новую эталонную культуру из коллекции микроорганизмов.

Этап 2. Проверка культуры на чистоту: готовят суспензию культуры и засевают ее на адекватные агаризованные питательные среды, обозначенные в Каталоге Коллекции ИЭГМ (www.iegmc.org), глубинным методом либо используют рассев петлей. Засеянные чашки Петри или пробирки инкубируют в оптимальных условиях, обозначенных в Каталоге Коллекции ИЭГМ (www.iegmc.org), в течение 3–6 сут. Совпадение морфологии и микроскопической картины выросших колоний свидетельствует о чистоте культуры.

Этап 3. Проверка степени диссоциации культуры: из 24-часовой бульонной культуры делают 10-кратные разведения физиологическим раствором. По 0,1 мл из 5-го и 6-го разведений засевают на 2 чашки питательного агара, предварительно подсушенные в термостате. Шпателем посевы распределяют по поверхности агара до полного исчезновения влаги и инкубируют в термостате при температуре 30 °С в течение 48–72 ч. Выбирают чашки, на которых выросло от 30 до 100 колоний. Проверку штамма на диссоциацию производят путем визуального просмотра изолированных колоний на чашках в прямом и косонаправленном свете через бинокулярную лупу или микроскоп на малом увеличении. В R-форме колонии бактерий более плоские, большего размера, неправильной формы с неровными краями и шероховатой, матовой поверхностью. При наличии диссоциации (по размеру, S- R-диссоциация, др.) подсчитывают количество измененных колоний и общее количество просмотренных колоний. Общее количество просмотренных бактерий не должно быть менее 30. Затем рассчитывают процент диссоциации по формуле: % диссоциации = (количество измененных колоний/общее

количество просмотренных колоний) $\times 100$ %. Если численность диссоциированных колоний превышает 25 %, то данная культура не пригодна для дальнейшего использования. В связи с выраженным полиморфизмом колоний для штаммов отдельных видов актинобактерий рода *Rhodococcus* оценка R-S диссоциации не проводится.

Этап 4. Оценка морфолого-культуральных, хемотаксономических и генетических свойств бактериальной культуры согласно паспортным данным.

4.1. Определение морфологии клеток проводят в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах (так как большинство других методов окраски может значительно повлиять на морфологию и размеры клеток), при этом учитывают размер клеток – длину и ширину с помощью окуляр-микрометра, предварительно определив цену деления по объект-микрометру, и общую морфологию клетки.

4.2. Окраску по Граму проводят по классическому методу, готовят стандартный мазок (тонкий), фиксируют в пламени горелки, на мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, наносят первый краситель генциан-виолет – так, чтобы бумага была полностью увлажнена и «блестела», выдерживают 5 мин. Затем снимают бумагу петлей и, не промывая мазок, наносят несколько капель раствора Люголя. Выдерживают до 1 мин, при этом препарат должен потемнеть, но не почернеть. Раствор Люголя сливают. Препарат опускают в ванночку с 96° этиловым спиртом на 45 сек. При этом каретку несколько раз приподнимают и опускают. Препарат промывают до «чистой воды». Наносят второй краситель фуксин на 2 мин. Препарат промывают и подсушивают на воздухе. Грамположительные бактерии – сине-фиолетовая окраска (1-й краситель), грамотрицательные бактерии – красно-розовая окраска (2-й краситель).

4.3. Для выявления соответствия видовых свойств бактериальной культуры паспортным сведениям проводится типирование культуры по физиолого-биохимическим свойствам до вида. Идентификацию рекомендуется проводить с использованием тест-систем биохимической идентификации конкретного макротаксона (Сем. *Nocardiaceae*, в частности), разрешенных к применению. При этом следует руководствоваться рекомендациями производителя. Правомочна постановка отдельных биохимических тестов для подтверждения следующих основных свойств: способность к образованию кислоты из глюкозы, фруктозы, глицерина, маннозы и неспособности продуцировать ее из сорбозы, рамнозы, целлобиозы, дульцита и рафинозы; способность усваивать соли пировиноградной, фумаровой, уксусной, пропионовой и масляной, но не щавелевой и винной кислот; рост и образование кислоты на арабинозе, галактозе, лактозе, мальтозе, сахарозе, инозите, салицине и α -метил-*D*-глюкозиде, а также усвоение натриевых солей α -кетоглутаровой, γ -аминомасляной, лимонной, молочной, фенилуксусной и янтарной кислот; разложение тирозина и наличие уреазы.

4.4. Хемотаксономические признаки культуры определяют при несоответствии результатов ранее проведенных (4.1-4.3) морфолого-культуральных и физиолого-биохимических тестов паспортным сведениям.

Определение моносахаридного состава гидролизатов целых клеток проводят методом бумажной хроматографии. Для этого к 200 мг сырой биомассы добавляют 5,0 мл 2 н H_2SO_4 , запаивают в ампулу и нагревают на водяной бане в течение 4 ч. Содержимое переносят в центрифужную пробирку и нейтрализуют, приливая по каплям (около 10 мл) насыщенный раствор $Ba(OH)_2$ до уровня pH 7,0. Полученный раствор центрифугируют (3000 об/мин, 10 мин), надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр в

фарфоровую ступку и упаривают на водяной бане (80°C) до объема 0,1 мл. Образец наносят на хроматографическую бумагу типа FN1 (7x40) ("FILTRAK", Германия) пастеровской пипеткой в три-четыре приема в одну точку после высушивания на воздухе предыдущей капли. Между опытными образцами наносят растворы "метчиков" (по 1,0 мкл каждого сахара после высушивания предыдущей капли). Бумагу с нанесенными образцами помещают в предварительно насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру. Разделение исследуемых веществ методом восходящей хроматографии происходит в течение 6 сут. с интервалами 2, 4, 7, 12 и три раза по 24 ч. Визуализацию пятен сахаров на хроматограмме осуществляют путем опрыскивания проявителем и нагревания в течение 15 мин при 105°C в сушильном шкафу. Пятна сахаров с четным количеством атомов углерода (гексоз) имеют буро-коричневую, с нечетным (пентоз) – коричнево-розовую окраску на светло-желтом фоне. При идентификации сахаров измеряют и сравнивают расстояния, пройденные "метчиками" сахаров и веществами, которые предполагалось обнаружить в анализируемой смеси.

Определение изомеров диаминопимелиновой кислоты (ДАПК) проводят в гидролизатах клеток коллекционных культур методом бумажной хроматографии. Для этого 10-15 капель гидролизата с помощью капилляра наносят на хроматографическую бумагу в одну точку, подсушивая бумагу на воздухе перед каждым последующим нанесением образца. Расстояние между образцами на хроматографической бумаге – 2 см. На бумагу в качестве контроля наносят 5–10 мкл гидролизата клеток типового штамма соответствующего вида актинобактерий, содержащих *мезо*-ДАПК, и стандартный раствор изомеров ДАПК. Бумагу с нанесенными образцами помещают в предварительно насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру. Разделение исследуемых веществ методом восходящей хроматографии на бумаге происходит в течение 18 ч, после чего бумагу вынимают из камеры, высушивают на воздухе и опрыскивают проявляющим реактивом с последующим высушиванием на воздухе и прогреванием при 105°C в течение 15 минут. Пятна диаминокислоты имеют зеленовато-желтый цвет, на хроматограмме располагаются ниже пятен других аминокислот, имеющих пурпурно-фиолетовую окраску. Пятно *мезо*-ДАПК располагается ближе к линии старта, LL-ДАПК – дальше.

Определение свободных жирных кислот коллекционных культур проводят с помощью хроматомасс-спектрометрии, для этого 15–30 мг клеточных липидов, экстрагированных из биомассы смесью хлороформ – метанол (2:1), помещают в колбу с боковым отростком. Растворитель удаляют в токе азота при 30°C. К остатку прибавляют 5,0 мл 0,3N метанольного раствора NaOH. Смесь кипятят, после кипячения охлаждают в течение 2 ч. К реакционной смеси общих липидов добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и 90%-ный раствор метанола с таким расчётом, чтобы раствор продуктов реакции заполнил весь объём бокового отростка колбы. В результате добавления фенолфталеина смесь окрашивается в малиновый цвет, что свидетельствует об успешном проведении щелочного гидролиза. Полученный раствор переливают в делительную воронку, и порционно (3–4 раза по 5 мл) приливают петролейный эфир для экстракции неомыляемых веществ (алкен-1-иловые эфиры глицерина, стерины, углеводороды, каротиноиды, высшие спирты и др.). Верхний слой (неомыляемые вещества) постоянно сливают в предварительно взвешенную колбу с притёртой крышкой. Водно-спиртовую фазу (нижний слой) подкисляют 6N HCl (0,3 мл) до обесцвечивания раствора и экстрагируют свободные жирные кислоты, порционно (3–4 раза по 5 мл) приливая

петролейный эфир. Верхний слой (свободные жирные кислоты) постоянно сливают в предварительно взвешенную колбу с притёртой крышкой, упаривают досуха в токе азота, сушат в вакуум-эксикаторе над NaOH. Полученный препарат свободных жирных кислот заливают свежеприготовленной смесью хлороформ – метанол (2:1) и хранят при температуре -4°C неограниченное время. Для идентификации свободные жирные кислоты переводят в метиловые эфиры с помощью кислотного гидролиза (2,5%-ный раствор хлористого водорода в метаноле) и анализируют на газовом хроматографе Agilent 6890N с квадрупольным масс-спектрометром “Agilent MSD 5973N” (“Agilent Technologies”, США). Для анализа используют капиллярную колонку RTX-5MS (30 м/0,25 мм/0,25 мкм с 5-ти метровой предколонкой). Кислоты идентифицируют путем сравнения характеристик удерживания неизвестных метиловых эфиров жирных кислот бактерий с таковыми стандартных метиловых эфиров жирных кислот.

Определение свободных миколовых кислот (липида LCN-A) проводят методом тонкослойной хроматографии метанолизатов целых клеток коллекционных культур. Для этого 200 мг сухой биомассы помещают в пробирку со шлифом, добавляют 5 мл метанола, 5 мл толуола и 0,2 мл концентрированной H₂SO₄, закрывают крышкой и выдерживают в термостате при 50°C не менее 12 ч. По истечении этого времени пробирку остужают до комнатной температуры, метилмиколяты экстрагируют в 2 мл *n*-гексана. С помощью микрокапилляра 5,0 мкл образца наносят в виде отдельного пятна диаметром 10 мм на тонкослойную хроматографическую пластинку типа Silufol UV 254 (150x150 мм, “Merck”, Германия) в несколько приемов в одну и ту же точку, при этом тщательно высушивая пятно на воздухе или с помощью вентилятора перед каждым последующим нанесением опытного образца. *Следует помнить*: непосредственный контакт следует осуществлять со слоем сорбента так, чтобы из микрокапилляра полностью выходил весь раствор. В качестве контроля используют метилмиколяты эталонных штаммов актинобактерий известной систематической принадлежности и с известным значением R_f пятен липида LCN-A на хроматограмме. Хроматографическое разделение миколовых кислот проводят в стеклянной камере, насыщенной парами растворителей. После подъема растворителя на высоту 13,5 см пластинку удаляют из камеры и высушивают на воздухе до полного испарения растворителя. Хроматографическое разделение миколовых кислот повторяют трижды. *Визуализацию пятен миколовых кислот на хроматограмме*. Проводят после опрыскивания фосфорномолибденовой кислотой и нагревания в сушильном шкафу при 105°C до появления пятен. Пятна свободных миколовых кислот располагаются между стартовой линией и дополнительно выявляемыми на хроматограмме пятнами не идентифицированных жирных кислот. Тип свободных миколовых кислот определяют по значениям коэффициента R_f разделенных метилмиколатов:

$$R_f = X / X_1,$$

где X – расстояние (см), пройденное веществом от точки старта (от исходного пятна на линии старта до середины пятна разделенного вещества); X₁ – расстояние (см), пройденное фронтом подвижной фазы за это же время: от линии старта (а не от края пластинки) до места, где находился фронт в момент окончания процесса хроматографирования.

4.5. Генотипирование коллекционных культур путем видоспецифичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводят при несоответствии результатов ранее проведенных (4.1-4.3) морфолого-культуральных и физиолого-биохимических тестов паспортным сведениям.

Клеточные лизаты коллекционных культур получают путем суспендирования единичной бактериальной колонии в 40 мкл 0,05М NaOH. Полученную суспензию инкубируют при 95°C в течение 15 мин, а затем замораживают – 15 мин. Цикл лизирования повторяют трижды. После этого лизаты центрифугируют при 14 тыс. об/мин в течение 2 мин с использованием микроцентрифуги (MiniSpin[®], Eppendorf, Германия). Для приготовления 25 мкл ПЦР-смеси используют 1 мкл полученного супернатанта. Амплификацию проводят с использованием программируемого термоциклера MJ Mini[™] (Bio-Rad Laboratories, США) и пар праймеров, сконструированных для экологически значимых видов актинобактерий. Реакционная смесь объемом 25 мкл имеет следующий состав (все реактивы производства «Синтол», Россия): 10 мМ ПЦР-буфер; 2,5 мМ MgCl₂ (в случае праймеров 27f и 1492r, а также Ru1 Ru2) и 1,5 мМ MgCl₂ (для праймеров Re1 и Re2); 0,2 мМ смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ); по 0,2 мкМ прямого и обратного праймера; 0,4 ед. Taq-ДНК полимеразы; 1 мкл ДНК, деионизированная вода. Используют температурно-временные режимы амплификации, специализированные для каждой пары праймеров. Полученные продукты амплификации анализируют при помощи электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле (Sigma, США) с использованием однократного TBE-буфера следующего состава (10× г/л): трис, 10,8 (99,8%, Sigma, США); борная кислота для электрофореза, 5,5 (Sigma, США); ЭДТА, 4 мл 0,5М, pH 8,0 (99,4%, Sigma); дистиллированная вода, 1 л (Short Protocols in Molecular Biology, 1995). Электрофоретическое разделение проводят при напряжении 80 В, силе тока 33 мА и мощности 3 Вт в течение 30-40 мин. По окончании электрофореза гель окрашивают водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Окрашенный гель просматривают в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories, США). Результаты ПЦР-диагностики документируют с помощью системы гель-документации Quantity One[®] 1-D Analysis Software (Bio-Rad).

Если культура не соответствует паспортным видовым свойствам или выявлено наличие посторонних микроорганизмов, то она не пригодна для дальнейшего использования.