



Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (КММ)  
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН)

№: СОП-013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 1 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

Стандартная операционная процедура «Секвенирование фрагментов гена 18S  
рРНК и ITS штаммов грибов и анализ полученных последовательностей»

СОП-013

УТВЕРЖДАЮ  
И.о. директора ТИБОХ ДВО РАН, к.б.н.  
Черников О.В.



2021 г.

Место нахождения документа: Электронная копия: Лаборатория морской биохимии, серверный компьютер, диск D, папка «СОПы» Бумажная копия: ТИБОХ ДВО РАН, Лаборатория морской биохимии, комната 219, папка «СОПы»		
Документ подготовлен: м.н.с. Балдаев С.Н.  15.10.2021	Документ проверен: Зав. ЛМБХ, к.м.н. Исаева М.П.  15.10.2021	Документ согласован: чл.-корр., д.б.н. Михайлов В.В.  15.10.2021

Владивосток 2021



№: СОП-013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 2 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

**об/мин** – оборотов в минуту

**п.н.** – пар нуклеотидов;

**ПЦР** – полимеразная цепная реакция;

**СОП** – стандартная операционная процедура;

**g** - относительное ускорение центрифуги.



№: СОП-013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 3 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Стандартная операционная процедура «Секвенирование фрагментов гена 18S рРНК и ITS штаммов грибов и анализ полученных последовательностей» - СОП-013 разработана в рамках научного проекта по теме «Развитие биоресурсной коллекции «Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН» для реализации Федеральной программы в области генетических технологий» (грант Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 15.BRK.21.0004, соглашение № 075-15-2021-1052 от «29» сентября 2021 года).

В документе подробно описываются протоколы для секвенирующей реакции, очистки ее продуктов, получения и анализа нуклеотидных последовательностей, а также требования к организации и условиям проведения экспериментальных процедур.

## 2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Стандартная операционная процедура разработана для стандартизации процессов подготовки ПЦР-фрагментов гена 18S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров ITS к секвенированию, определения нуклеотидных последовательностей на приборе и анализа полученных данных для молекулярно-генетической идентификации штаммов грибов.

Данный документ может быть использован сотрудниками лаборатории, выполняющими данную процедуру, специалистом, ответственным за работу на секвенаторе, а также для обучения нового персонала.

## 3. ИСТОРИЯ ВНЕСЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ

Отсутствует.

## 4. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА

Следование правилам техники безопасности и санитарного режима на рабочем месте является неукоснительным требованием для соблюдения всем персоналом, допущенным к работе в лаборатории.

В лаборатории имеется комплект инструкций по технике безопасности по каждому виду лабораторных работ. Ответственность за организацию безопасных условий труда в



№: СОП-013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 4 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

лаборатории возлагается в соответствии с приказом по учреждению на руководителя соответствующего подразделения или специально назначенное ответственное лицо.

Каждый сотрудник получает первичный инструктаж по технике безопасности при приеме на работу или возвращении к данному виду деятельности после длительного перерыва. Повторный плановый инструктаж проводят ежегодно, а внеплановый – при возникновении аварийных ситуаций или по распоряжению администрации учреждения. О прохождении инструктажа и допуске к самостоятельной работе в лаборатории делают отметку под роспись сотрудника в «Журнале проведения инструктажа по технике безопасности».

## 5. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПЕРСОНАЛА

Сотрудники лаборатории несут персональную ответственность за выполнение ими правил техники безопасности, соблюдение санитарного и противопожарного режимов на рабочем месте.

Сотрудникам лаборатории запрещено без разрешения руководителя подразделения выносить за пределы рабочей зоны исследуемые образцы и рабочую документацию лаборатории.

Сотрудники лаборатории обеспечивают качественное выполнение подготовки образцов к исследованиям, соблюдают правила проведения всех этапов исследования и своевременно предоставляют результаты исследований в соответствии с разработанными условиями (заполнение рабочего журнала, ведение электронной отчетности). Сотрудники лаборатории рационально используют реактивы и расходные материалы, обеспечивают сохранность лабораторного оборудования и лабораторных образцов на всех этапах исследования.

№: СОП-013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 5 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

### 6.1. Оборудование

- ламинарный бокс («Ламинарные системы», Россия) или аналог;
- амплификатор («Applied Biosystems», США) или аналог;
- генетический анализатор Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer («Thermo Fisher Scientific», США);
- холодильник с морозильной камерой;
- центрифуга с ротором для планшетов Eppendorf 5430 («Eppendorf», Германия) или аналог;
- микроцентрифуга настольная Multi-spin MSC-6000 («Biosan», Латвия) или аналог;
- вортекс BioVortex V1 («Biosan», Латвия) или аналог;
- вортекс для планшетов MS3 basic («КА», Германия) или аналог;
- микропипетки одноканальные на 0,5–2,5, 2–20, 10–100, 20–200, 100–1000 мкл («Eppendorf», Германия) или аналог;
- компьютер.

### 6.2. Расходные материалы

- пробирки на 0,2 мл, 1,5 мл («Axygen Scientific Inc.», США, «Thermo Fisher Scientific», США) или аналог;
- 96-луночные планшеты («Axygen Scientific Inc.», США) или аналог;
- пленка для 96-луночных планшетов («Axygen Scientific Inc.», США) или аналог;
- септа для 96-луночного планшета («Applied BioSystems», США);
- перчатки латексные неопудренные;
- маркеры перманентные;
- наконечники для микропипеток («Axygen», США, «Thermo Fisher Scientific», США) или аналог.

### 6.3. Реактивы

- набор BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing RR-100 («Applied BioSystems», США);
- набор BigDye® XTerminator™ Purification Kit («Applied Biosystems», США)



Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (КММ)  
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН)

№: СОП-013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 6 из 10
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

- вода деионизованная (mQ);
- праймеры для секвенирования («Евроген», Россия).



№: СОП– 013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 7 из 10
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

## 7. ПРОЦЕДУРА

В качестве материала для секвенирования используются очищенные ПЦР-фрагменты гена 18S рРНК и ITS штаммов грибов из КММ ТИБОХ ДВО РАН с известной концентрацией.

### 7.1. Общие положения

Приготовление реакционных смесей для секвенирующей реакции и очистка продуктов реакции проводятся в ламинарном боксе во избежание загрязнения помещения и последующей контаминации растворов чужеродной ДНК.

Подготовку бокса проводят до начала работ, очистку – по их окончании в соответствии с правилами санитарного режима в подразделении.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляется на генетическом анализаторе Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer («Thermo Fisher Scientific», США) специалистом лаборатории, установленным ответственным за прибор в соответствии с регламентом подразделения.

### 7.2. Секвенирование нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК бактерий

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов включает несколько этапов: постановку секвенирующей реакции, очистку полученных продуктов, и загрузку образцов в прибор.

#### 7.2.1. Секвенирующая реакция

Проведение секвенирующей реакции осуществляется с использованием коммерческого набора реагентов для секвенирования ДНК BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing RR-100 («Applied BioSystems», США):

- перед проведением реакции подготовьте и промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл, соответствующее 2X количеству образцов;
- медленно разморозьте BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix при +4 °С;
- подготовьте секвенирующую реакцию смесь для каждого образца в соответствии с таблицей 1;

№: СОП– 013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 8 из 10
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

Таблица 1 – Компоненты секвенирующей реакционной смеси в расчете на одну пробирку

Наименование	Объем
Big Dye Terminator v3.1	8 мкл
Праймер прямой/обратный, 3,2 пМоль	1 мкл
mQ H <sub>2</sub> O	до 20 мкл
Образец ДНК	20-50 нг

В секвенирующей реакции используются праймеры, представленные в таблице 2. Каждый из очищенных ПЦР-продуктов секвенируется с обоих концов – с использованием обоих праймеров, следовательно, на каждый ПЦР-продукт приходится 2 реакции. Для секвенирования ITS выбор праймеров основывается на анализируемом ПЦР-фрагменте.

Таблица 2 – Праймеры для секвенирования фрагментов 18S рРНК и ITS грибов

Мишень	Праймеры	5'→3' последовательность	Ориентация праймера
18SpРНК	18S_Hmag_For	GAAACTGCGAATGGC	Прямая
	18S_Hmag_Rev	AAGGGCAGGGACGTAATC	Обратная
ITS	ITSpr1	GCGTTGATATACGTCCCTGCC	Прямая
	ITSpr2	CTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTC	Прямая
	ITSpr7	ACTTCGGAGGGAACCAGCTAC	Обратная
	ITSpr9	CCTTGGTCCGTGTTCAAGA	Обратная

- перемешайте смеси на вортексе, сбросьте капли на микроцентрифуге;
- установите пробирки в амплификатор;
- задайте на приборе программу температурного режима, представленную в таблице 3, и запустите реакцию.



№: СОП– 013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 9 из 11
----------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	--------------

Таблица 3 – Температурный режим для секвенирующей реакции

Параметр	Этап				
	Инкубация	25 циклов			Ожидание
		Денатурация	Отжиг	Элонгация	
Температура	96 °С	96 °С	50 °С	60 °С	4 °С
Время	1 мин	10 сек	5 сек	4 мин	∞

По завершении реакции проводится очистка ее продуктов.

### 7.2.2. Очистка продуктов секвенирующей реакции

Очистка образцов перед секвенированием проводится с использованием набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit («Applied Biosystems», США):

- приготовьте стерильный 96-луночный планшет;
- перенесите образцы для секвенирования из пробирок в лунки 96-луночного планшета;
- в каждую лунку с образцом внесите 80 мкл SAM™ Solution, после чего добавьте 20 мкл BigDye XTerminator™ Solution, перемешайте интенсивным пипетированием;
- запечатайте планшет пленкой, поместите его на вортекс и перемешайте 30 мин при 1800 об/мин, после чего сбросьте капли центрифугированием 2 мин при 1000 g.

Очищенные пробы готовы для последующей процедуры секвенирования и могут храниться при температуре +4 °С в течение 2 недель.

### 7.2.3. Запуск секвенирования образцов на приборе

Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляется на генетическом анализаторе Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer («Thermo Fisher Scientific», США). Прибор должен находиться в готовом к эксплуатации состоянии перед загрузкой образцов.

Удалите пленку с 96-луночного планшета с подготовленными образцами, наденьте на него септу. Поместите планшет в генетический анализатор. Задайте необходимые параметры секвенирования.

Параметры секвенирования возможно задать как на самом приборе, так и с использованием программного обеспечения SeqStudio™ Plate Manager v.1.1.0.



№: СОП-013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 10 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

Для этого в разделе Plate отметьте необходимые лунки планшета, содержащие образцы для секвенирования, в разделе Dye set выберите Z\_ BigDye™ Terminator v.3.1, в разделе Run module выберите программу LongSeq\_BDX. Запустите прибор. Длина прочтения с использованием данного протокола составляет 800-850 н.п.

За процессом секвенирования можно наблюдать в личном кабинете облачного сервиса Thermo Fisher Scientific в разделе InstrumentConnect. По результату секвенирования формируются файлы в формате .ab1 в памяти генетического анализатора.

### 7.3. Анализ результатов секвенирования

После завершения секвенирования исследуемых образцов, полученные данные подвергаются анализу с помощью специальных программ.

На первом этапе анализа используется программа Sequence Scanner Software 2 («Applied Biosystem», США), которая позволяет просмотреть первичные данные, представленные в виде хроматограмм, и оценить ряд параметров, таких как уровень флуоресцентного сигнала по каждому из четырех нуклеотидов (высота пиков), уровень фонового сигнала, степень достоверности идентификации каждого нуклеотида в последовательности и др.

Оптимальный уровень флуоресцентного сигнала находится в диапазоне 500-10000. В случае более низкого сигнала могут возникнуть сложности с идентификацией нуклеотидов. Качественная хроматограмма должна быть представлена одним слоем с четко разделимыми пиками. Появление второго слоя может свидетельствовать о неоднородности образца вследствие его генетических особенностей, контаминации чужеродной ДНК, не аксенической культуры микроорганизмов. В случае получения хроматограмм неудовлетворительного качества необходимо провести дополнительную оптимизацию протоколов подготовки образцов к секвенированию.

На следующем этапе анализа используется программа MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), которая позволяет обрабатывать полученные данные, собирать перекрывающиеся фрагменты образца в одну нуклеотидную последовательность и редактировать ее и сравнивать исследуемые нуклеотидные последовательности между собой путем их выравнивания с использованием алгоритма ClustalW и построения филогенетических деревьев.



**Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (КММ)**  
**Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН)**

№: СОП-013	Дата создания: 15 октября 2021	Версия №: V 1.00	Дата текущая: 15 октября 2021	Стр. 11 из 11
---------------	-----------------------------------	---------------------	----------------------------------	---------------

Для установления таксономической принадлежности исследуемого штамма гриба, полученная нуклеотидная последовательность фрагмента его гена 18S рРНК или внутренних транскрибируемых спейсеров ITS сравнивается с референсными последовательностями, содержащимися в международной базе данных GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью алгоритма BLASTn (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).