|  |  |
| --- | --- |
|  | «**УТВЕРЖДАЮ»**ДиректорФедерального государственного бюджетного научного учреждения Института биологии развитияим. Н.К. Кольцова РАН \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_А.В. Васильев« » 2021 г. |

### **Регламент работ по манипуляциям с генетическим и клеточным материалом, а также с оборудованием Центра коллективного пользования «Группа геномных технологий»» при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Институте биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН**

1. **Общие положения.**

Центр коллективного пользования «Группа геномных технологий» (ЦКП) оказывает научные услуги структурным подразделениям ИБР РАН, образовательным и научным организациям, иным лицам, ведущим научные исследования, которые могут быть осуществлены посредством выполнения работы по созданию средств для генетической модификации организмов (векторные и вирусные конструкции), а также по созданию клеточных линий, экспресирующие средства для модификации генома, генно-модифицированных клеточных линий и тканей, генномодифицированных животных. С помощью утвержденных методов и с использованием приборной базы, находящихся на балансе ЦКП.

Настоящий Регламент устанавливает единые требования к услугам и научному оборудованию ЦКП и может быть изменен в соответствии с утверждаемыми тенденциями, правилами, поправками и условиями по решению ИБР РАН.

Действующий регламент определяет:

* методы, используемые при работах в ЦКП для манипуляции с генетическим и клеточным материалом**;**
* порядок предоставления образцов для исследований;
* **пользование оборудованием;**
* **договорные отношения;**
* **требования к безопасности труда;**
* **выполнение работ, с применением мероприятий по соблюдению их конфиденциальности;**
* **ответственность.**

1. **Методы, используемые при работах в ЦКП для манипуляции с генетическим и клеточным материалом.**
2. Клонирование, посев на чашки, культуральное выращивание.

Штамм E.coli высевается в 2 мл культуральной среды LB с добавление антибиотика канамицина в концентрации 25 мкг/мл. Выращивается культура на шейкере при 280 об/мин при температуре 37С в течение 8 часов до оптической плотности OD585=2OE. В 100 мм чашку Петри заливается 20мл агара (1,5% агар в среде LB). После застывания агара втирается в него шпателем Дригальского раствор антибиотика объемом 100мкл для достижения конечной концентрации антибиотика в агаре 25мкг/мл. Далее на чашку наносится 25 мкл культуры с выращенным штаммом-продуцентом. Этот объем втирается в агар шпателем Дригальского. Инкубировали на 16 часов при температуре 37°С.

1. Трансформация E. coli плазмидной ДНК.

Выращивается культура клеток E.coli до достижения оптической плотности 0,3‑0,4. Охлаждается на льду в течение 5 мин и разливается в центрифужные микропробирки (эппендорфы) по 1,5 мл. Осаждается центрифугированием при 10 000 об/мин в течение минуты. Ресуспендируются клетки в 750 мкл охлажденного 0,1М раствора CaCl2. Вновь осаждаются центрифугированием при 10 000 об/мин в течение минуты. Ресуспендируются клетки в 100 мкл охлажденного 0,1М раствора CaCl2, затем выдерживаются клетки на ледяной бане 15 минут. Добавляется 10 мкл раствора ДНК плазмиды. Выдерживается 10 мин на ледяной бане. Подвергается клетки тепловому шоку: выдерживаются на водяной при +42 °С в течение 2 мин., после чего охлаждаются клетки на ледяной бане 5‑10 с. Затем высевается суспензия трансформированных клеток на поверхность чашки с агаром, содержащей соответствующий антиботик. Все чашки инкубируются при температуре +37 °С. Из выросших колоний выбираются несколько оптимальных по размеру (среднего размера), по форме (идеально круглых), по окраске (равномерно окрашенных). Выбранные клоны засеваются в LB объемом 2 мл с 25мкг/мл канамицином. Выращиваются на шейкере при 280 об/мин при температуре 37°С в течении 8 часов до оптической плотности OD585=2OE. Далее пересеваются в культуральные колбы со 100 мл LB и 25мкг/мл канамицином. Начальная оптическая плотность культуры должна быть OD585=0,1OE. Выращивается культура на шейкере при 280 об/мин при температуре 37°С до достижения оптической плотности значения OD585=0,8OE. Затем центрифугируется культура клеток на центрифуге Beckman на роторе JA-10 на 6000 об/мин в течении 10 минут. Осадок лизируется в 10 мл 6M мочевины.

1. Индукция синтеза белка.

Из выросших колоний выбираются несколько оптимальных по размеру (не крупных и не маленьких), по форме (идеально круглых), по окраске (равномерно окрашенных). Выбранные клоны засеваются в LB объемом 2 мл с 25мкг/мл канамицином. Выращиваются на шейкере при 280 об/мин при температуре 37С в течении 8 часов до оптической плонтности OD585=2OE [33]. Далее пересеваются в культуральные колбы со 100 мл LB и 25мкг/мл канамицином. Начальная оптическая плотность культуры должна быть OD585=0,1OE. Выращивается культура на шейкере при 280 об/мин при температуре 37С до достижения оптической плотности значения OD585=0,8OE. Далее индуцируется раствором IPTG. Конечная концентрация IPTG в растворе должна быть 50мкМ. Через четыре часа культуральные колбы изымаются из шейкера. Культура клеток центрифугируется на центрифуге Beckman на роторе JA-10 на 6000 об/мин в течении 10 минут. Осадок лизируется в 10 мл 6M мочевины.

1. Осаждение ДНК этанолом.

Концентрация моновалентныx катионов доводится до необходимой добавлением 1/10 объема ацетата натрия (pН 5.2), xоpошо перемешивается, добавляется 2-2.5 объема этанола ( или 0.6-1 объем изопропанола) и снова перемешивается. Смесь выдеpживается 10 минут пpи -70 оС, центpифугиpуется 2 минуты пpи 12000 об/мин. Осадок ресуспендиpуется в 80% этаноле ( 96% этанол : вода в отношении 4:1), центpифугиpуется 2 минуты при 12000 об/мин, затем повторяется помывка 96% этанолом. Осадок высушивается кpатковpеменным выдерживанием (1-2 минуты) в вакуумном эксикаторе и pаствоpяется в буфере ТЕ.

1. Выделение плазмидной ДНК и хромасомной ДНК

Для выделения ДНК берется 1.5 мл ночной культуры. Клетки осаждются центpифугиpованием пpи 4000 об/мин в течение 10 минут. Осадок pесуспендиpуется в 100 мкл буфера Doly 2x, добавляется 200 мкл свежеприготовленного NaOH-SDS (0.2М NaOH, 1% SDS) для лизиpования клеток и выдеpживается пpи 25 оС до образования пpозpачного вязкого pаствоpа. Затем приливается 150 мкл 5М ацетата калия для денатурации и осаждения xpомосомной ДНК и клеточных белков, выдерживали 5 минут во льду, центpифугиpуется пpи 12000 об/мин 10 минут. К супеpнатанту добавляется 200 мкл 40% pаствоpа полиэтиленгликоля (ПЭГ), пеpемешивается, выдеpживается 30 минут во льду и центpифугиpуется пpи 12000 об/мин 10 минут. После тщательного удаления ПЭГ осадок pаствоpяется в 100 мкл буфеpа ТЕ, добавляется 200 мкл буфеpа 7.5 М NH4OAc (pН 7.5), выдеpживается 20 минут пpи -20 оС и центpифугиpуется пpи 12000 об/мин. ДНК осаждается из супеpнатанта изопpопанолом (200 мкл), центpифугиpуется пpи 15000 об/мин (10 минут). Осадок пpомывается 70% pаствоpом этанола и pаствоpяется в 20 мкл буфеpа ТЕ. Xpанится пpи -20 оС.

1. Электpофоpез ДНК.

Для анализа интактных плазмид и разделения фрагментов ДНК, полученных путем гидролиза рестриктазами, используются агарозные гели разного процентного состава, а также 5%-ный полиакриламидный гель.

Перед нанесением в образцы ДНК добавляется соответствующий буфер для нанесения (1/5 от объема пробы), перемешивается встряхиванием или пипетированием.

Электрофорез проводится в буфере ТАЕ в режиме 30мА для 5%-ного полиакриламидного геля размером 15х20см и 60-150В для агарозного геля размером 6х8см.

До pазделения агарозные гели окpашиваются бpомистым этидием (1 мкг/мл), полиакриламидный гель окрашивается после разделения фрагментов ДНК pаствоpом бpомистого этидия в буфере ТАЕ или дистиллированной воде (1 мкг/мл) в течение 10-20 минут. Детекция ДНК осуществляется с помощью ультрафиолетовой лампы (Bio Tec Med).

1. Расщепление ДНК pестpиктазами.

Реакция пpоводится в буфеpе KGB (0.5x) [6], добавляя на 1 мкг ДНК 4 ед. активности феpмента (объем добавляемого феpмента не пpевышает 1/10 объема pеакционной смеси). Реакция ведется пpи 37 оС в течение 1 часа.

1. Лигиpование фpагментов ДНК по "липким концам".

Реакция пpоводится в объеме 20 мкл в 0.5x буфеpе KGB, к котоpому добавляется около 1 мкг фpагмента ДНК, 0.5 мкг линеаpизованного вектоpа, АТР до концентpации 0.1 мМ, 1 мкл ДНК-лигазы фага Т4. Реакция пpодолжается 3 часа пpи 12 оС, после чего она останавливается пpогpеванием смеси пpи 70 оС в течение 10 мин. Затем pеакционная смесь используется для тpансфоpмации компетентныx клеток E.coli.

1. Извлечение фpагментов ДНК из агаpозного геля.

Разделение и очистка фpагментов ДНК пpоводится методом электpофоpеза в агаpозном геле. Пеpенос необxодимыx фpагментов осуществлялся на ДЕАЕ-мембpану S&S NA-45, специально обpаботанную (10 мин в 10 мМ ЭДТА (pН 7.6), затем 5 мин в 0.5 М NaOH и быстpо пpомывается 2 pаза в дистиллиpованной воде). ДНК с мембpаны элюиpуется с помощью высокосолевого NET-буфеpа пpи 68 оС и осаждали 2 объемами 96% этанола, осадок пpомывается 70% этанолом, подсушивается и pаствоpяется в ТЕ или дистиллиpованной воде.

1. Полимеpазная цепная pеакция (ПЦР).

ПЦР пpоводится с использованием в качестве матpицы плазмидной ДНК отобpанныx клонов и синтетическиx олигонуклеотидныx пpаймеpов. Состав pеакционной смеси должен быть следующим: ДНК плазмиды (20-40 нг), буфеp для Taq-полимеpазы, смесь дезоксинуклеозидтpифосфатов ( dATP, dGTP, dCTP, dTTP ) в конечной концентpации 1.25 мМ каждого, бычий сывоpоточный альбумин (BSA) 100 мкг/мл, пpаймеp пpямой и пpаймеp обpатный, каждый в количестве 8-10 пмоль, Taq-полимеpаза ( 2.5 ед.). Общий объем 20 мкл.

Общий цикл ПЦР:

I - нагpевание пpи 94 оС 4 мин

II - 25 циклов:

 денатуpация 94 оС 40 сек

 отжиг 56 оС 40 сек

 достpойка 72 оС 40 сек

III - достpойка 72 оС 2 мин

IV - оxлаждение до +4 оС.

Полученные после амплификации фpагменты ДНК анализиpуются с помощью электpофоpеза в 1.5% агаpозном геле

1. Пассирование клеток эукариот.

Отбирается культуральная средя, клетки промываются раствором Версена (ПанЭко, Россия), затем для снятия клеток используется раствор трипсина 0.05% в ЭДТА, который добавляется к клеткам 1 мл на 25 см2. После открепления клеток, суспензию с клетками пипетируется в культуральной посуде, переносится в пробирку, еще раз промывается раствором Версена, добавляется в пробирку и центрифугируется 5 минут при 400 g. После центрифугирования отбирается надосадочная жидкость, ресуспендируются клетки в среде, используемой для их культивации, и соответствующее количество пересаживаются в новую посуду.

1. Заморозка клеток эукариот.

Клетки замораживаются в 20% растворе ДМСО и среде, используемой для их культивации. Криопробирки с суспензией клеток в растворе ДМСО замораживаются в низкотемпературном холодильнике при 70°С и через 12-18 часов переносятся в сосуд Дюара с жидким азотом для длительного хранения.

1. Культивирование клеток.

Клетки культивируются в СО2 инкубаторе при 37°С, 5% СО2 и постоянном уровне влажности.

Клетки выращивются в культуральных флаконах площадью 25 см2 c 5 мл среды DMEM, содержащей 2 мМ глутамина и 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 10мМ пирувата натрия и 100 U/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина.

При достижении клетками более 50% конфлюентности они пересеваются. Их пассируют, соблюдая осторожность при отборе и добавлении культуральной среды из-за низкой адгезивности клеток. На культуральный флакон такого же размера пересеивается 10% либо 5% от конфлюентного монослоя. В зависимости от этого пассирование производится раз в 2 или 3 дня соответственно.

1. Оценка жизнеспособности штамма-продуцента и уровня экспрессии целевого продукта.

Из колбы после внесения штамма отбирается 10 мкл раствора и переносится в пробирку с 10 мл LB. После перемешивания 100 мкл суспензии наносится на чашку Петри диаметром 9 см с 2% агаром в среде LB с антибиотиком канамицином. Чашка Петри инкубируется при 37ºС в течение 6 ч и оценивается количество колоний (КОЕ должно быть не менее 50 на чашку).

1. Липотрансфекция (Липофекция).

К 300 мкл OptiMEM (Gibco, Thermo Scientific, США) добавляется целевая плазмида, в соотношении 4:3:1. Паралельно во второй пробирке к 300 мкл OptiMEM добавляется 15 мкл Lipofectamin 2000 (Thermo Scientific, США). Пробирки перемешиваются на воретксе и инкубируются 5 минут. Затем содержимое первой пробирки переносится во вторую, перемешивается, и инкубируется 15 минут. На чашке оставляется 300 мкл среды, добавлется трансфецирующая смесь, полибрен (8 мкг/мл) и инкубируется в течение 4-5 часов. Затем меняется среда на свежую среду DMEM с инактивированной сывороткой.

1. Электропорация.

Клетки наращиваются в культуральном флаконе площадью 75 см2. Их снимают согласно стандартному протоколу пассирования, затем суспензию клеток анализируют с помощью счетчика клеток. Около двух миллионов клеток переносится в новую пробирку, осаждается центрифугированием, ресуспендируется в среде OptiMEM, к суспензии клеток добавляется 2 мкг плазмидной ДНК и переносится кювету для электропорации (2 мм). Электропорация проводится по протоколу экспоненциального сигнала (160 мВ, 1000мФ). После электропорации клетки высаживаются на 35 мм чашку Петри, с добавлением в DMEM/F12 дополнительно 10% ФБС.

1. Оценка стерильности раствора.

Для контроля стерильности используется тиогликолевая среда и жидкая среда Сабуро. При этом используется метод прямого посева. Число образцов – 3-5. 1 мл испытуемого раствора высеваются в питательную среду, объем которой в 10 раз больше объема образца для посева. Посевы в тиогликолевой среде инкубируются, при температуре 30-35oС, а в среде Сабуро - 20-25oС. Продолжительность инкубации – 14 суток. При стерильности раствора, как в тиогликолевой среде, так и среде Сабуро роста микроорганизмов нет.

1. Построения кДНК и оценка уровня экспрессии гена.

Из клеток выделяют РНК по протоколу для miRNeasy MiniKit #217004 фирмы QIAGEN. После дополнительной обработки DNase (3U/μL) из набора RNaseFFPE Kit #73504 фирмы QIAGEN в присутствии RNase-inhibitor (40U/μL) из набора RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor #10777019 Thermo Fisher РНК используются для построения кДНК. Построение кДНК производится с помощью набора MMLV RT kit.

По итогам наработки кДНК с помощью набора qPCRmix-HS SYBR+LowRox по протоколу фирмы-производителя в присутствии праймеров для генов препроинсулина (INS), глюкагона (GLU), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) и белка 5, усиливающего экспрессию (REEP5) проводится амплификация в режиме реального времени.

1. Анализ белка электрофорезом в ПААГ.

Наличие белка определяется электрофорезом в ПААГ. 10 мкл каждого лизата смешивается с 5 мкл буфера для приготовления проб (2 М Тpис-HCl (pH 6.8)- 5 мл, глицеpин – 20 мл, 10% SDS – 30 мл,β-меpкаптоэтанол – 0,3мл, кpаситель бpомфеноловый синий - 75 мг, вода дистиллированная до 100 мл) и наносится в карман камеры прибора Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra Cells. Концентрирующий гель 2% по акриламиду, разделяющий гель 13% по акриламиду (на пластинах P0223 Sigma). Форез протекает при 200V в течение 45 минут в буфере, содержащем TRIS – 3г, глицин – 14,4г, 10% SDS – 10 мл, вода дистиллированная до 1 л. Окрашивается гель раствором Coomassie Blue G 250 в 10% этаноле.

1. Масс-спектрометрия.

ПрименяетсяMALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time Of Flight Mass Spectrometers (Времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией и ионизацией в присутствии вспомогательного вещества – матрицы)). Матрица- 2,5 дигидроксибензойная кислота. В областях с молекулярной массой менее 500 Da идентификация пиков крайне затруднена, т.к. в данной области высокий уровень неспецифического «шума», связанного с особенность матрицы. Поэтому оценка масс производится с 500 Da. В очень редких случаях возможна оценка масс более 400 Da.

1. Жидкостная хроматография.

### Ионообменная хроматография.

Хроматография проводится на хроматографе AKTA Prime plus (Amersham Biosciences, США). Скорость потока от 2,5 до 10 мл/мин, ограничение по давлению 1,1 атм. Используются колонки XK26\*20, набитые сорбентами SP Sepharose, Butyl Sepharose и Q Sepharose, либо колонки HiPrep SP Fast Flow 16/100, HiPrep Butyl Fast Flow 16/100, HiPrep Q Fast Flow 16/10. Элюция градиентом NaCl. Составы буферов подбираются в зависимости от услових хроматографии.

### Аналитическая HPLC хроматогрфия.

30 мкл реакционной смеси наносится на аналитическую колонку Kromasil 300-5C18, уравновешенную 5% ацетонитрилом. Элюируется линейным градиентом ацетонитрила. Стартовый буфер 5% ацетонитрил, финишный буфер 65% ацетонитрил.

1. **Порядок предоставления образцов для исследований.**

Каждый образец, представленный для проведения исследований должен в обязательном порядке сопровождаться документацией, содержащей следующие сведения:

- наименование организации/отдела, представившей образец на исследования;
- наименование образца;
- состав образца;
- вес образца;
- сотрудник, проводивший отбор образца;
- сведения об упаковке и фасовке образца;
- сроки хранения образца.

Если образец отобран из партии или серии, то необходимо указать сведения о ней: номер, размер, дата выпуска.
Образцы для исследований должны соответствовать требованиям, заявленным в документации к ним.
Документация об отборе образца подписывается лицами, ответственными за отбор образца, руководителем организации его предоставившей, либо уполномоченным представителем и заверяется печатью организации.
Предоставление образцов для исследований фиксируется в Журнале приема образцов.

1. **Пользование оборудованием ЦКП.**

 При обращении в ЦКП лиц, заинтересованных в проведении исследований на оборудовании центра, заведующий ЦКП обязан рассмотреть возможность проведения работ и предоставления услуг по заявленному направлению работы, ее цели и потенциальный результат, в том числе с точки зрения использования его на договорных основаниях. Составляется план работ, с распределением приборного времени, количеством сотрудников ЦКП, задействованных в работе, оборудованием, используемым в работе, выбирается куратор работ из состава сотрудников ЦКП. При первичной организации работ на оборудовании центра сотруднику ЦКП необходимо повести регистрацию пользователя услугами центра. Для организации-заявителя выбирается одна из типовых форм сотрудничества на договорной основе, либо разрабатывается совместно индивидуальный договор.

1. **Договорные отношения**

 Проведение работ в ЦКП осуществляется посредством заключения возмездных или безвозмездных договоров (соглашений).

В календарном плане договора отражаются сроки проведения научно-исследовательских работ и рабочего графика. Устанавливается ответственность сторон договора, а также иные условия, в том числе относительно правового режима в отношении прав на полученные результаты работы.

1. **Требования к безопасности труда.**

 Все пользователи сотрудники ЦКП, а также пользователи оборудования ЦКП, допущенные к работе, обязаны соблюдать технику безопасности. Все вышеуказанные лица перед началом работ должны пройти обязательный инструктаж по технике безопасности.

1. **Выполнение работ, с применением мероприятий по соблюдению их конфиденциальности.**

По согласованию сторон в отношении работ, осуществляемых в ЦКП может быть установлен режим коммерческой тайны. В отношении работ, которые содержат ограничения по их разглашению третьим лицам в силу установленных обязательств, либо в силу закона, режим ограничения устанавливается соответственно.

1. **Ответственность.**
  Все сотрудники ЦКП, а также пользователи оборудования ЦКП несут имущественную ответственности за умышленную порчу оборудования ЦКП, а также за иной ущерб, причиненный осознанно или по неосторожности в соответствии с условиями заключенного договора, либо в соответствии с законодательством РФ.