

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00570-01
Название:	Оценка аутентичности штаммов вируса АЧС, хранящихся в коллекции микроорганизмов полимеразной цепной реакцией и севенированием	Страница 1 из 8

Версия № 01	Дата введения 30.11.2017
Причина пересмотра:	

Утверждение процедуры	Должность	Ф.И.О.	Подпись	Дата
Разработал	Старший научный сотрудник	Бурмакина Г.С.		«27» 11 2017г.
Согласовал	Руководитель Государственной коллекции микроорганизмов	Бальшев В.М.		«27» 11 2017г.
Согласовал	Заместитель директора по диагностическим исследованиям	Егорова И.Ю.		«27» 11 2017г.
Согласовал	Заместитель директора по НИР	Малоголовкин А.С.		«28» 11 2017г.
Согласовал	Начальник ОСМК	Бобкова Т.Е.		«28» 11 2017г.
Утвердил	Директор ФГБНУ ФИЦВиМ	Колбасов Д.В.		«28» 11 2017г.

1. Цель.

Данная СОП устанавливает порядок проведения процедур, необходимых для оценки аутентичности штаммов вируса АЧС, хранящихся в Государственной коллекции микроорганизмов.

2. Область применения.

Данная стандартная операционная процедура применяется для оценки аутентичности штаммов вируса АЧС при плановом переосвежении штаммов вируса АЧС, хранящихся в Государственной коллекции микроорганизмов.

3. Распределение ответственности.

Ответственность за координацию работ, регламентированных настоящим СОП, несет начальник отдела Государственной коллекции микроорганизмов.

Ответственность за реализацию работ, регламентированных настоящей СОП, несут сотрудники, прошедшие обучение по оценке аутентичности штаммов вируса АЧС.

Оценку аутентичности штаммов вируса АЧС осуществляют научные сотрудники, младшие научные сотрудники, старшие научные сотрудники имеющие высшее ветеринарное, биологическое или медицинское

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00570-01
Название:	Оценка аутентичности штаммов вируса АЧС, хранящихся в коллекции микроорганизмов полимеразной цепной реакцией и севенированием	Страница 2 из 8

образование, прошедшие обучение процедурам пробоподготовки (выделение нуклеиновых кислот, постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР), электрофорез и очистка ПЦР-продукта), секвенирования фрагментов генома штаммов вирусов и анализ нуклеотидных последовательностей, сдавшие зачет по биологической безопасности и допущенные к работам приказом директора ФГБНУ ФИЦВиМ.

Техническое обеспечение работ (стерилизация и обеззараживание посуды, подготовка боксовых помещений, приготовление дезинфицирующих растворов) проводят микробиологи.

Приготовление растворов для проведения процедур по оценке аутентичности штаммов вируса АЧС осуществляют младшие научные сотрудники.

4. Требования безопасности.

Работу проводят согласно требованиям СП 1.3.2322-08.

При приготовлении материалов для пробоподготовки и секвенирования следует соблюдать требования:

- МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности;
- «Инструкция по охране труда для сотрудников подразделений ГНУ ВНИИВВиМ»;
- СОП ВС-00069-01 «Инструкция по ветеринарно-санитарному режиму и технике безопасности при работе в боксе»;
- «Правила Электробезопасности».

5. Процедура.

5.1. Общие положения

5.1.1. Все работы с вирусом АЧС проводят в боксированных помещениях.

5.1.2. Подготовку боксового помещения, в котором проводятся работы с ПБА, проводят до начала работ, обеззараживание - по их окончании в соответствии с требованиями Инструкции по соблюдению требований ветеринарно-санитарного режима и противозидемической безопасности в подразделении.

5.1.3. Перед проведением работ готовят рабочий (5 %) и аварийный (10 %) растворы хлорамина Б по СОП ОО-00470-01. Срок годности растворов 15 суток. Контроль концентрации АДВ в рабочих и аварийных растворах проводят при помощи химических индикаторов серии ДЕЗИКОНТ-ХЛОРАМИН.

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00570-01
Название:	Оценка аутентичности штаммов вируса АЧС, хранящихся в коллекции микроорганизмов полимеразной цепной реакцией и севенированием	Страница 3 из 8

5.2. Материалы:

- Штаммы вируса АЧС, хранящиеся в Государственной коллекции микроорганизмов;
- Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» («Интерлабсервис», Россия). Хранить при температуре плюс 4 ± 2 °С – 1 шт;
- Коммерческий набор и реактивы для ПЦР Master Mix OneTaq («NEB», Англия) или аналог. Хранить при температуре минус 20 °С – 1 шт;
- Агароза универсальная («Хеликон», Россия). Хранить при комнатной температуре – 8 г;
- 6х буфер для нанесения проб («NEB», Англия). Хранить при температуре минус 20 °С – 1 шт;
- 50х электрофорезный буфер (ТАЕ): 2М Трис-НСl, 0,05М EDTA, 1М ледяная уксусная кислота. Хранить при комнатной температуре – 0,1 л;
- Бромистый этидий (10 мкг/мл). Хранить при комнатной температуре – 0,0008 г;
- Маркер Quick-Load 100 п.н. длин ДНК («NEB», Англия) или аналог. Хранить при температуре минус 20 °С – 1 шт;
- Коммерческие набор и реактивы для очистки ПЦР-продуктов из агарозного геля и реакционной смеси Cleanup Standard («Евроген», Россия) или аналог. Хранить при комнатной температуре – 1 шт;
- Набор реагентов для секвенирования BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems», США). Хранить при температуре минус 20 °С – 1 шт;
- Универсальный оптимизированный полимер для проведения капиллярного электрофореза 3130 Pop7 Perfomance Optimized Polymer («Applied Biosystems», США). Хранить при температуре плюс 4 °С – 0,5мл;
- 3130 10XBuffer с EDTA («Applied Biosystems», США) – 2мл;
- Hi-Di Formamide («Applied Biosystems», США) – 0,1мл;
- Коммерческий набор и реактивы для очистки продуктов реакции секвенирования BigDye XTerminator Purification Kit («ThermoFisher Scientific», США). Хранить при температуре 4 ± 2 °С – 1 шт;

5.3. Оборудование, расходные материалы, инвентарь:

- 3130 and 3100 series reservoir septa («Applied Biosystems», США) – 1 шт;
- 3130/3100 Avant Capillary Array 80cm («Applied Biosystems», США) – 1 шт;
- 96 well plate base («Applied Biosystems», США) – 1 шт;
- 96 well plate retainer («Applied Biosystems», США) – 1 шт;
- MicroAmp Optical 96 well reaction plate («Applied Biosystems», США) – 1 шт;
- Plate septa 96 well («Applied Biosystems», США) – 1 шт;

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00570-01
Название:	Оценка аутентичности штаммов вируса АЧС, хранящихся в коллекции микроорганизмов полимеразной цепной реакцией и севенированием	Страница 4 из 8

- Автоматический одноканальный дозатор, объемом от 1 до 10 мкл – 1 шт;
- Автоматический одноканальный дозатор, объемом от 20 до 100 мкл – 1 шт;
- Автоматический одноканальный дозатор, объемом от 100 до 1000 мкл – 1 шт;
- Автоматический одноканальный дозатор, объемом от 2 до 20 мкл – 1 шт;
- Автоматический одноканальный дозатор, объемом от 5 до 50 мкл – 1 шт;
- Автоматический секвенатор AB3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) – 1 шт;
- Амплификатор, например, Т-100 («Bio-Rad», США) – 1 шт;
- Бахилы медицинские – 5 шт;
- Бокс абактериальной воздушной среды (Россия) – 1 шт;
- Ведро – 2 шт;
- Весы аналитические – 1 шт;
- Ветошь для мытья пола – 2 м;
- Вода дистиллированная – 2 л;
- Воронка полимерная диаметром 100 мм – 1 шт;
- Вортекс FV-2400 Biosan – 1 шт;
- Емкость для общелабораторного применения – 1 шт;
- Зажим для пакета для деструкции – 1 шт;
- Камера для горизонтального электрофореза (SE-1 «Хеликон», Россия), с источником питания (Эльф-4 «Хеликон», Россия) – 1 шт;
- Комбинезон защитный противочумный одноразовый – 1 шт;
- Компьютер – 1 шт;
- Маркер перманентный – 1 шт;
- Маски медицинские (12-ти слойные) – 1 шт;
- Медицинский вакуумный отсасыватель с колбой ловушкой OM-1 (Россия) – 1 шт;
- Микроволновая печь VT-1681 («Vitek», Россия) – 1 шт;
- Мыло антибактериальное жидкое – 0,1 л;
- Наконечники пластиковые без фильтра 200 мкл – 50 шт;
- Наконечники пластиковые с фильтром 100 мкл – 50 шт;
- Наконечники пластиковые с фильтром 1000 мкл – 50 шт;
- Наконечники пластиковые с фильтром 20 мкл – 20 шт;
- Одноразовые микроцентрифужные пробирки, объемом 0,2 мл – 50 шт;
- Одноразовые микроцентрифужные пробирки, объемом 0,6 мл – 10 шт;
- Одноразовые микроцентрифужные пробирки, объемом 1,5 мл – 15 шт;
- Пакет для деструкции – 1 шт;

ФГБНУ ФИЦВВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00570-01
Название:	Оценка аутентичности штаммов вируса АЧС, хранящихся в коллекции микроорганизмов полимеразной цепной реакцией и севенированием	Страница 5 из 8

- Перчатки латексные медицинские одноразовые – 15 шт;
- Полотенце бумажное рулонное – 1 шт;
- Система гельдокументирования («BioRad», США) – 1 шт;
- Спектрофотометр NanoDrop Lite («ThermoScientific», США) – 1 шт;
- Спирт – 0,5 л;
- Термостат для микропробирок Термит («Хеликон», Россия) – 1 шт;
- Халат одноразовый – 5 шт;
- Химический индикатор серии ДЕЗИКОНТ-ХЛОРАМИН – 5 шт;
- Хлорамин Б – 0,5 кг;
- Холодильник бытовой (4 °С) – 1 шт;
- Центрифуга для микропробирок MiniSpin («Eppendorf», Германия) – 1 шт;
- Центрифуга настольная плашечная Eppendorf Centrifuge 5804R («Eppendorf», Германия) – 1 шт;
- Центрифуга-вортекс SM-70M Elmi – 1 шт;
- Цилиндры измерительные – 2 шт;
- Шапочка медицинская одноразовая – 5 шт;
- Швабра с черенком – 2 шт;
- Штатив для микроцентрифужных пробирок объёмом 0,6 мл – 1 шт;
- Штатив для микроцентрифужных пробирок объёмом 1,5 мл – 1 шт.

5.4. Экстракция ДНК вируса АЧС из образцов вирусосодержащего материала, хранящегося в коллекции микроорганизмов.

Процедура экстракции ДНК вируса АЧС производится в соответствии с инструкцией производителя, прилагаемой к коммерческому набору. Для выделения суммарной ДНК используется комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» («Интерлабсервис», Россия).

5.5. ПЦР-амплификация фрагментов ДНК.

5.5.1. Для оценки аутентичности вирусных штаммов используют нуклеотидные последовательности генов р72, СР204L, Е183L, В602L вируса АЧС, представленные в паспорте на данный штамм вируса или в международной базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.5.2. Олигонуклеотидные праймеры, программы амплификации и состав реакционной смеси для ПЦР используют аналогичные тем, которые были использованы при определении молекулярно-генетических характеристик данного штамма вируса (СОП 00577-01 «Молекулярно-генетическая характеристика штаммов/изолятов вируса африканской чумы свиней»).

5.5.3. Для постановки полимеразной цепной реакции используют Master Mix OneTaq («NEB», Англия), согласно инструкции производителя. Для

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00570-01
Название:	Оценка аутентичности штаммов вируса АЧС, хранящихся в коллекции микроорганизмов полимеразной цепной реакцией и севенированием	Страница 6 из 8

постановки ПЦР используют амплификатор T100 («Bio-Rad», США). Работу на приборе проводят согласно инструкции производителя.

5.6. Электрофорез в агарозном геле.

Анализ продуктов амплификации осуществляется при помощи электрофореза в 2,0 % агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА и напряжении 150 В.

Результаты ПЦР оцениваются путем обнаружения специфических полос в треках с исследуемыми образцами относительно фрагмента маркера молекулярного веса и расчетного значения длины ПЦР-продукта относительно каждого амплифицируемого фрагмента генома.

Электрофорез проводится в течение 30-40 минут. Результаты электрофореза учитываются в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм с использованием системы геледокументирования («BioRad», США). Регистрация полученных результатов проводится с помощью геледокументирующей системы. После регистрации результатов специфическая полоса вырезается чистым скальпелем из геля и помещается в заранее подготовленную пронумерованную микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф.

5.7. Очистка полученного ПЦР-продукта из агарозного геля.

Очистка производится с помощью коммерческого набора Cleanup Standard («Евроген», Россия), согласно инструкции производителя. Затем концентрация очищенного ПЦР-продукта измеряется на спектрофотометре NanoDrop Lite. Работу на приборе проводят согласно инструкции производителя.

5.8. Постановка реакции секвенирования.

Постановку реакции секвенирования проводят в соответствии с инструкцией производителя (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_081527.pdf). Для постановки реакции секвенирования используют амплификатор T100 («Bio-Rad», США). Работу на приборе проводят согласно инструкции производителя.

5.9. Очистка продуктов реакции секвенирования и загрузка в секвенатор.

Очистка продуктов реакции секвенирования коммерческим набором BigDye XTerminator Purification Kit производится в соответствии с прилагаемой инструкцией. В случае получения слишком интенсивного флюоресцентного сигнала при избыточной концентрации очищенного продукта реакции, образец может быть разведён формамидом до оптимального соотношения. Загрузка секвенатора AB3130 Genetic Analyzer осуществляется в соответствии с инструкцией производителя.

5.10. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов p72, CP204L, E183L, B602L штамма вируса АЧС с референтными последовательностями.

Для оценки аутентичности вирусного штамма используется сравнение полученных в ходе нуклеотидного секвенирования последовательностей генома вируса с нуклеотидными последовательностями, представленными в

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00570-01
Название:	Оценка аутентичности штаммов вируса АЧС, хранящихся в коллекции микроорганизмов полимеразной цепной реакцией и секвенированием	Страница 7 из 8

паспорте на данный штамм вируса или в международной базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Выравнивание и сравнение последовательностей проводится с использованием программы BioEdit. Для сравнения с последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank, используется сервер BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

6. Термины и определения.

6.1. ПЦР – метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций ДНК в биологическом материале.

6.2. Секвенирование – определение первичной нуклеотидной последовательности цепи ДНК.

7. Сокращения.

7.1 ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота.

7.2 ПЦР - полимеразная цепная реакция.

7.3 СОП – стандартная операционная процедура.

7.4 ФГБНУ ФИЦВиМ – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии».

8. Ссылки.

8.1. «Инструкция по охране труда для сотрудников подразделений ГНУ ВНИИВВиМ».

8.2. СОП ВС-00069-01 «Инструкция по ветеринарно-санитарному режиму и технике безопасности при работе в боксе».

8.3. «Правила Электробезопасности».

8.4. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

8.5. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)».

8.6. СОП ОО-00470-01 «Инструкция по приготовлению дезинфицирующих растворов «Хлорамина Б».

8.7. СОП 00577-01 «Молекулярно-генетическая характеристика штаммов/изолятов вируса африканской чумы свиней».

10. Приложения.

Приложение 1 – Лист ознакомления с требованиями СОП.

11. История внесения изменений.

Отсутствует.

