

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН
А.В. Васильев
« 15 » марта 2017 г.

Регламент
содержания и доступа к Коллекции линий дрозофил
ЦКП по биологии развития на основе использования клеточных технологий и
оптических методов исследований при
Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Общие положения.

В связи с тем, что основными задачами Коллекции линий дрозофил являются идентификация, поддержание и распространение линий дрозофил группы *virilis* и группы *melanogaster*, для использования в фундаментальных и прикладных научных исследованиях, а также пополнение Коллекции новыми линиями, необходимо, чтобы Коллекция отвечала следующим требованиям (критериям):

1) Линии дрозофил в Коллекции должны быть охарактеризованы с помощью классических методов систематики и современных молекулярно-генетических методов. Процедуры идентификации и проверки соответствия декларируемой видовой принадлежности и соответствия указанному генотипу должны проводиться периодически, не реже 1 раза в год, в соответствии с СОПами (см. Стандартные Операционные Процедуры при работе с коллекцией дрозофил – Приложение Б).

2) В Коллекции имеется система документирования (для каждой линии дрозофил, находящейся в Коллекции, имеется набор характеристик, отражающий всю информацию, по каждой линии и манипуляций с ней, начиная с момента попадания в Коллекцию), а также система маркировки, исключая потерю и перепутывание материала.

3) Помещения, в которых содержится Коллекция и ведется работа по поддержанию линий, используемые материалы, оборудование и процедуры должны отвечать разработанной системе требований по контролю условий труда в соответствии с российскими и международными нормативами. Основные нормативные документы: 1. Трудовой кодекс Российской Федерации. Принят 30 2001 г. 197-ФЗ (с изменениями и дополнениями). 2.

Федеральный закон от 27.12.2002 г. № 184 – ФЗ «О техническом регулировании». 3. ГОСТ Р 12.0.001-2013 Система стандартов безопасности труда. Основные положения. 4. Постановление Правительства Российской Федерации от 27 декабря 2010 г. № 1160. Положение о разработке, утверждении и изменении нормативных правовых актов, содержащих государственные нормативные требования охраны труда. 5. Постановление Минтруда России от 17 декабря 2002 г. № 80. Об утверждении Методических рекомендаций по разработке государственных нормативных требований охраны труда.

В том числе, помещения для ведения коллекционной работы должны быть оборудованы системой поддержания постоянной температурой (25°C), вытяжками, микроскопическим оборудованием.

4) В перспективе каждая линия будет иметь паспорт с информацией об истории ее создания, молекулярных маркерах, условиях культивирования, копия которого должна выдаваться получателям данной линии, а также должен существовать электронный каталог имеющихся в Коллекции линий с их паспортами, доступный в сети интернет.

5) Поддержание линий дрозофил осуществляется путем регулярных пересевов на новую кормовую среду, каждые 2-3 недели, на основе визуального контроля состояния и численности очередного поколения. Используется стандартная кормовая среда на основе агар-агара, манки, сахара, дрожжей и изюма.

6) Доступ к Коллекции дрозофил для сотрудников ИБР РАН осуществляется через предварительную запись в журнал заказов. Ответственный за коллекцию сотрудник формирует заказы во время очередного посева коллекционных линий. Для сотрудников других учреждений доступ к Коллекции дрозофил осуществляется по предварительной договоренности и с разрешения Руководителя Коллекции.

7) Процедура передачи линий дрозофил пользователям вместе с информацией, достаточной для культивирования данных линий в их лабораториях, а также с подписанием в отдельных случаях Соглашения о передаче материалов.

8) Постоянная работа над пополнением Коллекции ведется посредством приобретения (из международных фондов и коллекционных фондов зарубежных лабораторий) и получения (в ходе экспериментальной работы и экспедиционных сборов) новых линий дрозофил.

Основные мероприятия, обеспечивающие корректную работу с коллекцией.

Сохранение коллекции обеспечено многократным дублированием линий в составе пересеваемого «пучка» пробирок, независимым пересевом культур из каждой пробирки и регулярной проверкой соответствия морфологических и генетических характеристик указанному генотипу линии. В перспективе планируется организация криохранилища линий дрозофил на стадии имаго.

Для заказчиков линий Коллекции Регламент содержит Перечень актуальных услуг, оказываемых заинтересованным пользователям с учетом нагрузки, Используемые методики и Перечень основного технологического оборудования (Приложение А).

Контроль соблюдения стандарта, ответственность

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры молекулярно-генетического анализа, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие воздействие на персонал аллергенными веществами (диэтиловый эфир, микрочастицами ваты, испарениями кондиционированной личинками дрозофил кормовой среды).

Оборудование, используемое при проведении молекулярно-генетической диагностики линий, проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения регламента возлагается на Руководителя коллекции. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Приложение А.

Перечень актуальных услуг, оказываемых заинтересованным пользователям с учетом нагрузки.

1. Обеспечение заинтересованных учебных и научных организаций линиями дрозофил с заданными характеристиками (происхождение, генотип и т.п.).
2. Проведение заказных исследований с использованием коллекционных линий в совместных работах с представителями внешних организаций.
3. Проведение учебно-практических мероприятий со школьниками и студентами по ведению линий и постановке генетических экспериментов с дрозофилой.
4. Предоставление по предварительной договоренности отработанных имаго после пересева коллекционных фондов в качестве корма для лабораторных животных (рыбы, амфибии, рептилии).

Перечень основного технологического оборудования.

1. Бинокулярные лупы и микроскопы (Lomo 9, Lomo 10, Micromed MC-2 Zoom, Carl Zeiss 'Jenalumar').
2. Суховоздушные термостаты с охлаждением и поддержанием фотопериода.
3. Шкафы сушильные стерилизационные сухожарочные.
4. Пароварка.
5. Источники УФ.
6. Блендер.
7. Весы.
8. Сплит-системы.
9. Холодильники.
10. Суточный таймер 16A Electraline 59500.
11. Очиститель воздуха.
12. Ламинары и ПЦР-боксы.
13. Амплификаторы (Терцик, VeritiFast Applied Biosystem)
14. Секвенатор DNA analyser 3500
15. Чипридер и чипрайтер Perkin Elmer

Используемые методики.

1. Классические методы поддержания коллекционных линий дрозофил, отбора по полу и фенотипическим признакам, постановки скрещиваний при ведении линий с отбором и синтезе новых линий с генетическими маркерами и трансгенными конструкциями.
2. Методы выделения ДНК, амплификации и секвенирования при проверке генотипа коллекционных линий.
3. Методы микроскопирования и оценки количественных и цитогенетических признаков дрозофил коллекционных линий.

Руководитель Коллекции

д.б.н.



Куликов А.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. Кольцова РАН
 Лаборатория эволюционной генетики развития

Стандартные операционные процедуры (СОП) содержания и развития
«Коллекция дрозофил»

**Объединенная коллекция лабораторных животных для фундаментальных,
 прикладных и природоохранных исследований**

Составил	Согласовал	Утвердил
С.н.с. лаборатории эволюционной генетики развития Лазебный О.Е. 	Зав. Лабораторией эволюционной генетики развития Куликов А.М. 	Директор ИБР РАН Васильев А.В. 
«15» марта 2017г	«15» марта 2017г	 «15» марта 2017г

Москва, 2017

Применение

Процедура применима к содержанию коллекционных линий дрозофил и соблюдению своевременной проверки соответствия декларируемым стандартам коллекционных линий.

Цель

Обеспечение оптимальных условий пересева линий дрозофил и соблюдения регламента проверки указанного генотипа коллекционных линий.

Определения

Линия – коллекционная культура дрозофил определенного вида с указанным генотипом и/или фенотипом.

Кормовая среда – изготавливаемая по стандартной методике пищевая смесь для содержания дрозофил.

«Пучек» - независимо ведущиеся в индивидуальных пробирках культуры данной линии дрозофил.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Секвенирование – определение последовательности ДНК маркерного локуса с целью идентификации видовой принадлежности образца.

Пересевание – перенос имаго дрозофил на новую кормовую среду.

Генотипирование на чипах – определение молекулярных маркеров с целью точной идентификации линии.

Список литературы

Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics Ralph J Greenspan. Cold Spring Harbor Laboratory. 2004. 191 pp., ISBN : 087969711

Медведев И.Н. Практическая генетика. М.: Наука, 1968, 297 с.

Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975, 580 с.

Ответственность

Старший лаборант, осуществляющий работу с коллекционными фондами; старший научный сотрудник, проводящий регулярную проверку соответствия коллекционных линий декларируемым признакам; руководитель коллекции.

Порядок действий

1. Визуальный контроль состояния линий в коллекционном фонде осуществляется 2 раза в неделю, понедельник/вторник и четверг/пятница. Линии ведутся в количестве 6-7 независимых культур в «пучке», при температуре 25 °С и 20-часовом световом режиме для линий дрозофил группы *virilis*, и световом режиме 12x12 для всех остальных видов.
2. Пересев коллекционных линий проводится по мере необходимости, не реже одного раза в три недели. Пересев осуществляется из пробирки в пробирку, с визуальным контролем по основным фенотипическим признакам данной коллекционной линии. При подозрении на наличие неуказанных для данной линии признаков в пересеваемой пробирке вызывается научный сотрудник, ответственный за состояние коллекционного фонда. Пробирки с засором уничтожаются, из пробирок с «чистой» линией готовят дубликаты для восстановления числа независимо ведущихся отводок данной линии.
3. Кормовая среда для пересева линий готовится по предварительному заказу, в соответствии со стандартной методикой, и хранится в подготовленных пробирках в бытовом холодильнике при температуре +2+4 °С не более 5-и суток. При использовании пробирок с кормом из холодильника время прогревания в помещении до температуры не ниже 20°С составляет не менее часа.
4. Регулярная проверка соответствия признаков фенотипа всех коллекционных линий указанному в каталоге коллекции производится ответственным научным сотрудником один раз в полгода, анализ линий дикого типа видов-близнецов на соответствие указанному в каталоге виду по молекулярным митохондриальным маркерам производится один раз в год.
5. Визуальная проверка ведется по признакам фенотипа куколок и имаго с использованием бинокулярной лупы при увеличении объектива лупы x2. Проверка молекулярных маркеров ведется путем выделения ДНК из выборки не менее 10 дрозофил из коллекционной линии, с последующей амплификацией и секвенированием маркерного фрагмента по стандартным методикам.

Пересмотр СОП

Пересмотр СОП осуществляется 1 раз в год, в связи с совершенствованием методов контроля молекулярно-генетических признаков и пополнением коллекции линиями с новыми требованиями к содержанию.