

«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 замороженных и фиксированных
(консервированных) тканей диких животных
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 замороженных и фиксированных тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований (далее – Коллекция) являются создание и поддержание коллекции замороженных и фиксированных тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований, включающих оценку биоразнообразия, таксономические исследования, изучение филогенетических отношений и филогеографии видов, а также пополнение Коллекции новыми образцами, необходимо, чтобы Коллекция отвечала определенным требованиям (критериям). Регламент Коллекции поддержан Правилами хранения и использования коллекционного фонда (Приложение А).

Требования (критерии) применяемые к Коллекции:

1) Для образцов в Коллекции должны быть описаны видовая принадлежность, по возможности, подвидовая принадлежность, дата и место сбора, фенотипические характеристики особей и иные параметры, необходимые для проведения фундаментальных и прикладных научных исследований.

2) Данные об образцах формируются при проведении экспедиций по сбору материала для пополнения фондов Коллекции или при передаче образцов в Коллекцию в соответствии с условиями договора или соглашения с авторами сборов (далее – коллекторы).

3) В Коллекции имеется система каталогизации и хранения (для каждого образца, находящегося в Коллекции, имеется набор характеристик, отражающий всю информацию о

доступных данных об образце, наличии и типах материала, а также по проведенным манипуляциям, начиная с момента попадания в Коллекцию), а также система маркировки, исключающая потерю и перепутывание материала.

4) Образцы в Коллекции должны быть охарактеризованы с помощью классических современных молекулярно-генетических методов. Процедуры проверки соответствия декларируемой видовой принадлежности и определения генотипа проводятся по мере поступления образцов в Коллекцию в соответствии с СОПами (Приложение Б).

5) Помещения, в которых содержится Коллекция и ведется работа по депонированию образцов ДНК, 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 температуры (25° С), вытяжками, оборудованием для хранения образцов и работы с коллекцией, морозильниками для хранения выделенных образцов ДНК.

6) Доступ к Коллекции для сотрудников ИБР РАН осуществляется через предварительную запись в журнал заказов. Ответственный за коллекцию сотрудник формирует заказы по мере поступления. Для сотрудников других учреждений доступ к Коллекции осуществляется по предварительной договоренности и с разрешения Руководителя Коллекции.

7) Процедура передачи образцов Пользователям вместе с информацией, достаточной для исследования образцов в их лабораториях, а также с подписанием в отдельных случаях Соглашения о передаче материалов, осуществляется в соответствии с российским и международным законодательством, в том числе об охране редких и особо ценных видов. По предварительной договоренности с Пользователем необходимые молекулярно-генетические исследования могут быть проведены в рамках заключенного договора о совместной научно-исследовательской работе на базе ИБР РАН с привлечением, в случае необходимости, иных сторонних организаций.

8) Постоянная работа над пополнением Коллекции ведется в ходе экспедиций, одной из целей которых является сбор тканей представителей диких животных в природе и обмен между коллекционными фондами профильных научных и природоохранных организаций. Сбор тканей в дикой природе проводится в соответствии с СОПами (Приложение Б). Ответственность за исполнение российского и международного законодательства, регламентирующего исследования представителей дикой фауны, редких и особо ценных видов при сборах образцов для Коллекции лежит на коллекторах.

9) Поддержание Коллекции осуществляется путем хранения замороженных и/или законсервированных образцов при стандартной температуре в соответствии с Правилами хранения коллекционного фонда Коллекции замороженных и фиксированных тканей диких животных и образцов ДНК (Приложение А). Проверка сохранности коллекционных фондов осуществляется не реже, чем: для замороженных тканей 1 раза в 3 года; для фиксированных в этаноле тканей 1 раза в 2 года.

Основные мероприятия, обеспечивающие корректную работу с коллекцией.

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

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 потенциальных аллергенов и/или иных биологически активных компонентов от коллекционного материала.

Оборудование, используемое при проведении молекулярно-генетической диагностики, 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.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН



А.В. Васильев

« 15 » марта 2017 г.

**Правила
хранения и использования коллекционного фонда
Коллекции замороженных и фиксированных (консервированных)
тканей диких животных
для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований,
поддерживаемой в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН**

1. Общие положения

- 1.1. Правила хранения коллекционного фонда Коллекции замороженных и фиксированных тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований (далее – Правила) определяют порядок и условия хранения коллекционного фонда Коллекции.
- 1.2. Правила применимы к выполнению регламентных и исследовательских работ, выполняемых с Коллекцией.
- 1.3. Сотрудники и пользователи, работающие с Коллекцией обязаны соблюдать настоящие Правила.
- 1.4. Правила разрабатываются руководителем Коллекции и утверждаются Директором ИБР РАН.
- 1.5. Изменения и дополнения в настоящие Правила вносятся распоряжением Директора ИБР РАН за его подписью.

2. Определения

- 2.1. Единица хранения – образцы тканей одной особи животного, хранящиеся в коллекции.
- 2.2. Образец – некоторое количество ткани одного животного, отобранное в отдельную емкость для фиксации и дальнейшего хранения.

3. Требования к оборудованию и емкостям для хранения

- 3.1. Образцы хранятся при пониженной температуре. Замороженные ткани хранятся при температуре не выше -60°C , фиксированные в этаноле – не выше $+4^{\circ}\text{C}$.
- 3.2. Для хранения образцов тканей применяются низкотемпературные морозильники (кельвинаторы) и промышленные и бытовые холодильники.
- 3.3. Для обеспечения сохранности надлежащего качества образцов не допускается нарушения температурного режима хранения. При манипуляциях с образцами или в случае непредвиденных обстоятельств допускается кратковременное повышение температуры

содержания: замороженных образцов тканей до температуры -20°C не более чем на 3 часа; фиксированных в этаноле тканей – до комнатной температуры не более чем на 24 ч. Не допускается повышение температуры замороженных тканей выше 0°C .

- 3.4. Кельвинаторы должны иметь систему аварийного поддержания заданной температуры.
- 3.5. Холодильники должны иметь систему регулировки и контроля температуры в рабочей области.
- 3.6. Все кельвинаторы и холодильники должны комплектоваться системами хранения материала, рассчитанными на помещение стандартных криобоксов.
- 3.7. Криобоксы предназначены для хранения флаконов с образцами тканей. Криобоксы должны соответствовать параметрам: размеры в мм $135 \times 135 \times 50$, количество ячеек 81 или 100, материал должен быть устойчивым к низким температурам (ниже -80°C) и воздействию влаги. Ячейки криобокса должны быть пронумерованы.
- 3.8. Емкости для хранения образцов представляют собой пластиковые пробирки емкостью до 2 мл. Форма и размер пробирок должны обеспечивать помещение их в ячейку криобокса. Пробирки должны закрываться герметически, быть устойчивыми к воздействию сверхнизких температур (до -210°C) и химических веществ. Пробирки с образцом должны иметь этикетку, устойчивую к воздействию сверхнизких температур и органических растворителей.

4. Система каталогизации и хранения

- 4.1. Система каталогизации образцов коллекционного фонда Коллекции замороженных и фиксированных тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований предназначена для обеспечения хранения и использования единиц хранения коллекции в научно-исследовательских экспертных работах.
- 4.2. Каждой единице хранения соответствует одна отдельная запись в электронном каталоге коллекции. Каждая запись в электронном каталоге содержит следующую информацию о единице хранения: коллекционный (идентификационный) номер; таксономическая принадлежность; место отлова, включая географические координаты; дата отлова; дата фиксации образцов; источник получения; пол; возраст; стандартные морфологические промеры; характеристики половой системы; диплоидный набор хромосом (если известно); хранящийся материал с адресами хранения образцов; имена коллекторов, ссылки на депонированные последовательности ДНК; библиографические ссылки на работы, в которых использовался материал и другие дополнительные сведения.
- 4.3. В системе каталогизации принята сквозная последовательная нумерация единиц хранения. Каждая особь обозначается индивидуальным идентификационным номером, представляющим собой пятизначное число.
- 4.4. Каждый образец имеет уникальный шифр, состоящий из коллекционного номера и адреса ячейки хранения. Коллекционный номер указан на этикетке пробирки с образцом, адрес ячейки хранения заносится в соответствующее поле электронного каталога. Адрес ячейки хранения состоит из буквенного обозначения холодильника, в котором хранится образец, номера криобокса и номера ячейки в криобоксе.
- 4.5. Холодильники для хранения образцов обозначаются заглавными латинскими буквами (А, В, С, D и т.д.). Криобоксы в коллекции имеют уникальный номер в соответствии со сквозной последовательной нумерацией. Нумерация криобоксов начинается с верхней полки холодильника А и проставляется справа налево и сверху вниз.
- 4.6. При помещении образца на хранение адрес ячейки хранения заносится в электронный каталог коллекции. При переносе образца в другую ячейку в электронный каталог заносится новый адрес ячейки.
- 4.7. Система каталогизации и хранения образцов Коллекции контролируется при проведении инвентаризации коллекционного фонда и в процессе обращения пользователей к коллекции. Изменение и модернизация системы каталогизации и хранения производятся по мере необходимости на основании решения руководителя коллекции по согласованию с руководством ИБР РАН.

5. Инвентаризация и профилактика

- 5.1. Инвентаризация коллекционных фондов проводится по мере необходимости, но не реже 1 раза в 3 года.
- 5.2. Результаты инвентаризации оформляются актом.
- 5.3. В ходе инвентаризации проверяется соответствие коллекционных фондов и регистрации образцов в каталоге коллекции, наличие хранящихся зарегистрированных образцов, проводится оптимизация системы хранения, оценивается качество и сохранность образцов.
- 5.4. Профилактические мероприятия по обеспечению сохранности образцов в кондиционном состоянии проводятся по мере необходимости, но не реже: для замороженных тканей 1 раза в 3 года; для фиксированных в этаноле тканей 1 раза в 2 года.
- 5.5. При проведении профилактических работ оценивается сохранность образца, проводится осмотр пробирок, оценка их целостности; контроль объема и состояния фиксатора, сохранность этикетки. При необходимости осуществляется замена пробирки, этикетки, замена или долив фиксатора.
- 5.6. Запись о проведении профилактических работ вносится в соответствующее поле электронного каталога Коллекции.

6. Предотвращение заражения образцов чужеродным биоматериалом (контаминации)

- 6.1. Заражение образцов тканей чужеродным биоматериалом (контаминация) затрудняет, а в большинстве случаев исключает, использование образцов в молекулярно-генетических исследованиях.
- 6.2. Для предотвращения контаминации необходимо выполнять правила работы с образцами:
 - 1) Работа с образцами проводится в отведенном для этой цели месте.
 - 2) Инструменты для работы с образцами тканей должны быть чистыми. Для обработки каждой единицы хранения применяется отдельный набор инструментов. В случае невозможности соблюдения данного требования, набор инструментов тщательно очищается перед обработкой каждой единицы хранения: инструменты отмываются в обычной и дистиллированной воде, обжигаются в пламени горелки.
 - 3) Обязательным условием является проведение манипуляций с образцами тканей в хирургических резиновых перчатках.
 - 4) Ткани образца не должны контактировать с загрязненными поверхностями, инструментами, кожей или одеждой сотрудника.
 - 5) Для исключения возможности кросс-контаминации образцов при манипуляциях следует избегать работы с двумя и более открытыми образцами в одном рабочем пространстве одновременно.

7. Подготовка пробообразцов Коллекции для передачи сторонним пользователям для научных исследований

- 7.1. Передача образцов сторонним пользователям для проведения научных исследований осуществляется на основании заявки от исследователей или в рамках совместных с сотрудниками ИБР РАН научных проектов.
- 7.2. Сторонним пользователям передается часть образцов/образца отобранных от одной особи животного. Следует избегать передачи сторонним пользователям последнего образца единицы хранения без остатка.
- 7.3. Для передачи пробообразца следует отобрать часть ткани из образца с соблюдением требований для предотвращения контаминации и поместить в чистую пробирку. Пробирка, предназначенная для передачи этикетуется в соответствии с требованиями маркировки образцов Коллекции.
- 7.4. Вместе с пробиркой прообразца внешнему пользователю передается вся необходимая для использования информация из электронного каталога, относящаяся к данному образцу.
- 7.5. Передача образцов осуществляется с соблюдением требований, предъявляемым к транспортировке замороженных и фиксированных образцов при соответствующем терморегиме.

8. Пополнение Коллекции

- 8.1. Пополнение Коллекции является постоянной задачей для сохранения ее актуальности и научной ценности.
- 8.2. Пополнение коллекционных фондов происходит в ходе полевого сбора материала в природных популяциях животных сотрудниками ИБР РАН путем отлова живых и сбора фрагментов павших особей.
- 8.3. Сбор образцов для коллекции проводится в соответствии с требованиями СОП «Отбор проб тканей у особей диких животных».
- 8.4. Пополнение коллекционных фондов может проводиться путем обмена и безвозмездного получения образцов из музейных коллекций и от специалистов по коллекционируемым группам.
- 8.5. Поступающие в Коллекцию образцы каталогизируются и хранятся в соответствии с требованиями настоящих Правил.

9. Перечень актуальных услуг, оказываемых заинтересованным пользователям с учетом нагрузки.

- 9.1. Обеспечение заинтересованных учебных и научных организаций образцами тканей и ДНК диких животных с заданными характеристиками (вид, место обитания, генотип и т.п.).
- 9.2. Проведение заказных исследований с использованием коллекционных образцов в совместных работах с представителями внешних организаций.
- 9.3. Проведение учебно-практических мероприятий с заинтересованными пользователями по постановке генетических экспериментов на коллекционном материале.
- 9.4. Оказание консультационной помощи в работе с коллекцией, базой данных коллекционных материалов, в подготовке научных статей и иных научно-практических результатов, основанных на работе с коллекцией.

10. Перечень основного технологического оборудования.

- 10.1. Низкотемпературный морозильник New Brunswick.
- 10.2. Холодильники.
- 10.3. Ламинары и ПЦР-боксы.
- 10.4. Амплификаторы (Терцик, VeritiFast Applied Biosystem).
- 10.5. Секвенатор Applied Biosystems 3500.
- 10.6. Чипридер и чипрайтер Perkin Elmer.
- 10.7. Источники УФ.
- 10.8. Весы.

11. Используемые методики.

- 11.1. Методы выделения ДНК, амплификации, ПЦР-типирования рестрикционным анализом, секвенирования по Сэнгеру и кДНК-микроарреев при описании генотипа коллекционных образцов.

Составитель:

Руководитель Коллекции, к.б.н.



Брандлер О.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. Кольцова РАН
Лаборатория эволюции генома и механизмов видообразования

**Стандартные операционные процедуры (СОП) содержания и развития
«Коллекции замороженных и фиксированных тканей диких животных»
Объединенная коллекция тканей диких животных для фундаментальных,
прикладных и природоохранных исследований**

Составил	Согласовал	Утвердил
В.н.с. лаборатории эволюции генома и механизмов видообразования Брандлер О.В.  «15» <u>03</u> 2017 г.	И.о. Зав. Лабораторией эволюции генома и механизмов видообразования Галимов Я.Р.  «15» <u>марта</u> 2017 г.	Директор ИБР РАН Васильев А.В.   «15» <u>марта</u> 2017 г.

Москва, 2017

Применение

Процедура применима к образцам тканей диких животных, включаемых в Коллекцию.

Определение

Образец – некоторое количество ткани одного животного, отобранное в отдельную емкость для фиксации и дальнейшего хранения.

Цель и условия

Отбор тканей у диких животных производится с целью дальнейшего их использования для выделения препаратов ДНК в молекулярно-генетических исследованиях и для иных научно-исследовательских работ. Собранные образцы тканей должны соответствовать следующим требованиям: в образце не допускается присутствие чужеродной биологической ткани (контаминации); ткань должна быть зафиксирована в условиях, сохраняющих структуру ДНК; каждый образец должен иметь маркировку надежно его идентифицирующую.

Ответственность

Коллектор, научный сотрудник, осуществляющий работу с животными и проводящий отбор образцов; руководитель коллекции.

Порядок работы

I. Отбор внутренних тканей животного.

1. Животное умерщвляется стандартным способом с соблюдением требований биоэтики.
2. Отбор образцов тканей производится непосредственно после забоя и не более чем через 1 ч.
3. Вскрытие животного проводится в соответствии с правилами вскрытия диких животных и с соблюдением норм безопасности. Обязательным условием является проведение процедуры в хирургических резиновых перчатках.
4. Инструменты для вскрытия и отбора образцов тканей должны быть чистыми. Для обработки каждого экземпляра животного применяется отдельный набор инструментов. В случае невозможности соблюдения данного требования, набор инструментов тщательно очищается перед обработкой каждой особи: инструменты отмываются в обычной и дистиллированной воде, обжигаются в пламени горелки.

5. Образцы тканей (печени, почек, мышц, селезенки, семенников и пр.) после отбора помещаются непосредственно в пробирку для фиксации или на чистую поверхность, например, фольгу для дальнейшего помещений в емкость для фиксации. Нельзя использовать подложку для временного помещения образцов многократно. Ткань перед фиксацией тщательно измельчается.
6. Образцы тканей, помещенные в пробирки, немедленно фиксируются:
 - а) помещением в среду с низкой температурой (в емкость с жидким азотом или в морозильник с температурой не выше -60°C). Допускается предварительное помещение образцов в морозильник с температурой -20°C с дальнейшим переносом в низкотемпературные условия.
 - б) помещением в фиксатор, состоящий из этанола. Чистый этиловый спирт добавляется в емкость с образцом в объемном соотношении ткань:этанол 1:3. Этанол, применяемый для фиксации тканей не должен содержать посторонних биологических молекул и иных примесей. Не допускается соприкосновение этанола для фиксации тканей с инструментами, обтирочным материалом, руками препаратора и пр. посторонними предметами. Отбор жидкости из флакона со спиртом проводится только чистым инструментом (пипеткой или др. приспособлением).

II. Отбор тканей без забоя животного

7. Животное обездвигивается с помощью механической фиксации или наркоза.
8. Часть тела животного, предназначенная для отбора (фаланг пальцев, части хвоста, уха, покровная ткань и др.), протирается водой и этиловым спиртом для очистки от загрязнений и дезинфекции.
9. Чистым инструментом необходимая часть тела отрезается. Далее с образцом проводятся процедуры в соответствии с п.6.
10. Рана животного, возникшая вследствие операции, обрабатывается дезинфицирующими и ранозаживляющими средствами, при необходимости накладывается повязка. Животные, предназначенные для возвращения в место обитания, передерживаются до заживления раны.
11. Собранные образцы тканей транспортируются в Коллекцию: замороженные при постоянной низкой температуре (не выше -20°C); фиксированные в этанольном фиксаторе при температуре не выше 20°C .

III. Генотипирование образцов

12. Для проведения генотипирования из образца отбирается необходимое количество ткани.
13. ДНК выделяется из ткани стандартным солевым методом (Aljanabi, Martinez, 1997) или иным пригодным стандартным методом выделения ДНК.
14. Выделенному образцу ДНК присваивается ID образца по базе данных.
15. Методами ПЦР, секвенирования по Сэнгеру и/или генотипирования на чипах проводится определение генотипа особи по маркерным локусам митохондриального и ядерного геномов, с помощью программы BLAST (NCBI, США) проводится подтверждение заявленной видовой принадлежности образца. В случае отсутствия маркерных локусов данного вида в базе данных NCBI проводится первичное определение нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров для вида с депонированием результатов в базу данных NCBI.
16. Данные о результатах молекулярного определения видовой принадлежности заносятся в электронный каталог Коллекции.
17. Выделенный и этикетированный образец ДНК хранится при температуре не ниже -20°C . При расходовании образца ДНК на исследования в электронный каталог вносится соответствующая отметка.
18. Образец, из которого была выделена ДНК, возвращается в исходную ячейку хранения и хранится в стандартных условиях.

Пересмотр СОП

Пересмотр СОП осуществляется по мере необходимости, но не реже 1 раза в 5 лет, в связи с совершенствованием методов сбора материала для молекулярных исследований.