«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ИБГ РАН
академик РАН

_____ **Г.П. Георгиев**

«__» _____ **2024** г.

Регламент

содержания и доступа к Коллекции генoредактированных линий дрозофил Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Общие положения.

В связи с тем, что основными задачами Коллекции является поддержание и распространение генoредактированных линий дрозофил для проведения фундаментальных, поисковых и прикладных научных исследований в области молекулярной генетики, а также пополнение Коллекции новыми линиями, необходимо, чтобы Коллекция отвечала следующим требованиям (критериям):

1) Поскольку линии дрозофил в Коллекции имеют уникальные модификации (делеции, инсерции, маркеры) отдельных генов, они должны быть охарактеризованы с помощью классических генетических и современных молекулярно-генетических методов. Процедуры идентификации и проверки соответствия указанному генотипу должны проводиться в соответствии с СОПами (см. Стандартные Операционные Процедуры при работе с коллекцией – Приложение Б).

2) В Коллекции имеется система документирования – набор характеристик и манипуляций, отражающий актуальную информацию (генотип, картирование редактированного района) по каждой линии – и система индивидуальной маркировки, исключающая потерю и смешивание материала.

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

Федеральный закон от 27 декабря 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, 18°С), вытяжными шкафами и 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, доетупный 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 ИБГ РАН осуществляется через предварительную запись в журнал заказов. Ответственный за коллекцию сотрудник формирует заказы во время очередного пересева коллекционных линий. Для сотрудников других учреждений доступ к Коллекции дрозофил осуществляется по предварительной договоренности и с разрешения Куратора 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 получения в ходе экспериментальной работы 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 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 отработанных имаго после пересева Коллекции, или отдельных линий бескрылых дрозофил в качестве корма для лабораторных животных (рыбы, амфибии, рептилии).

Перечень основного технологического оборудования.

1. Бинокулярные лупы и микроскопы ()
2. Суховоздушные термостаты с охлаждением
3. Шкафы сушильные стерилизационные сухожарочные.
4. Пароварка
5. Источники УФ.
6. Блендер
7. Весы
8. Сплит-системы
9. Холодильники
10. Очиститель воздуха
11. Ламинары и ПЦР-боксы
12. Амплификаторы ()

Используемые методики.

1. Классические методы поддержания 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, амплификация и секвенирование при проверке генотипа коллекционных линий.
3. Методы микроскопирования и оценки морфологических признаков и маркерных мутаций дрозофил коллекционных линий.

Руководитель Коллекции
Директор ИБГ РАН Георгиев Г.П.

Приложение Б

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА

Отдел регуляции генетических процессов

Стандартные операционные процедуры (СОП) содержания и развития «Коллекции генноредактированных линий дрозофил ИБГ РАН»

Составил	**Согласовал**	**Утвердил**
С.н.с. лаборатории молекулярной организации генома ИБГ РАН Симонова О.Б. «16» декабря 2024 г.	Руководитель Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН Максименко О.Г. «16» декабря 2024 г.	Директор ИБР РАН Георгиев Г.П. «16» декабря 2024 г.

Москва, 2024

1. СОП № 1 “Содержание и контроль состояния коллекционных линий дрозофил”
2. СОП № 2 “Регулярная проверка соответствия генотипа всех коллекционных линий дрозофил указанному в каталоге коллекции”
3. СОП № 3 “Молекулярно-генетическая диагностика коллекционных линий дрозофил”
4. СОП № 4 “Пополнение коллекционных фондов новыми линиями дрозофил с редактированным геномом”
5. СОП № 5 “Приготовление кормовой среды для коллекции дрозофил”
6. СОП № 6 “Обработка отработанной посуды и подготовка к дальнейшему использованию”

СОП № 1
“Содержание и контроль состояния коллекционных линий дрозофил”

Применение
Процедура применима к организации процесса поддержания коллекционных линий дрозофил, включающего контроль состояния единиц хранения и пересев линий на свежую кормовую среду.

Цель
Стандартизация процесса поддержания коллекционных линий дрозофил в целях соблюдения генетической чистоты, целостности и подлинности (аутентичности) материала.

Определения
Линия – коллекционная культура дрозофил определенного вида с указанным генотипом и/или фенотипом.
Единица хранения – индивидуальная линия дрозофил коллекции.
«Пучок» - несколько стаканов с культурой дрозофил одной линии, развитие в которых находится на разных стадиях.
Кормовая среда – изготавливаемая по стандартной методике пищевая смесь для содержания дрозофил.
Пересев культуры – перенос имаго дрозофил на новую кормовую среду.

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
Научный сотрудник, старший научный сотрудник, зоолаборант

Последовательность действий

1.1. **Подготовка свежей кормовой среды.** Готовые стаканы с кормовой средой для дрозофил хранятся в холодильнике при t - 4°. Перед проведением СОП стаканы с кормовой средой необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин.
1.2. **Подготовка рабочего места.** Для работы с коллекционными линиями дрозофил на рабочем месте необходимо иметь:

- Резиновый коврик размером 10х15 см
- Маркер перманентный спирторастворимый для нанесения маркировки на стаканы
- Стерильная фильтровальная бумага ГОСТ Р 57642-2017
- Емкость с раствором детергента для отбросов имаго
- Морилка, заправленная диэтиловым эфиром ГОСТ 22300-76
- Набор препаровальных игл
- Перо или кисть для работы с наркотизированными дрозофилами
- Бинокулярная лупа
- Ящик для сбора отработанных стаканов.

1.3. Пучок, с которым ведется работа, вынимается из ящика для хранения и устанавливается перед исполнителем.

1.4. Визуально оценивается состояние культуры.

- По цвету и состоянию поверхности корма определяется вероятность бактериального, грибкового или клещевого заражения культуры. В случае необходимости оценка проводится при помощи бинокулярной лупы. В случае выявления заражения культура отставляется в карантин.
- Оценивается однородность культуры по внешним фенотипическим признакам (видимые мутации). В случае необходимости используется бинокулярная лупа. В случае подозрения на засор культуры пучок отставляется для проверки куратором коллекции.
- Оценивается необходимость пересева на свежую кормовую среду. Пересеву подвергаются:

а) стаканы, в которых идет выход молодых имаго из куколок;

б) стаканы, в которых находятся родительские особи и уже началось развитие. Наличие яиц и появление личинок оценивается визуально. В случае необходимости используется бинокулярная лупа;

в) стаканы, в которых находятся родительские особи, развитие не началось, но состояние корма не является удовлетворительным;

Пересеву подвергается, как правило, 1/3 – 1/4 пучка.

1.5. **Пересев культуры**. На стакане для пересадки указывается маркировка: идентификационный номер культуры и дата пересева.

- Ватная пробка из стакана со свежей кормовой средой извлекается непосредственно перед пересевом.
- Имаго стряхивают со стенок стакана посредством постукивания дном стакана о резиновый коврик.
- Имаго пересыпают в стакан со свежей кормовой средой.
- Лишние имаго усыпляют эфиром и утилизируют в емкости с детергентом.
- В заключение необходимо проверить плотность прилегания ватной пробки к стенкам стакана во избежание возможной контаминации культуры.
- В случаях разжижения кормовой среды в связи с активным развитием в стакан добавляют кусочек стерильной фильтровальной бумаги.
- Пучок перевязывают банковской резинкой и устанавливают в ящик для хранения

1.5. Хранение коллекции дрозофил осуществляется в термостатируемом кондиционируемом помещении, а также в термостатируемых шкафах при температуре 25^{o} С и световом режиме 12х12.

1.6. В журнале для заказов необходимо оставить заявку на приготовление кормовой среды для следующего пересева.

Периодичность

Процедура (СОП №1) осуществляется 1-2 раза в неделю.

Пересмотр СОП

Пересмотр СОП осуществляется 1 раз в год, в связи с изменением количества единиц хранения и новыми требованиями к содержанию.

СОП № 2
"Регулярная проверка соответствия генотипа всех коллекционных линий дрозофил указанному в каталоге коллекции"

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

Цель
Соблюдение генетической чистоты, целостности и подлинности (аутентичности) образцов путем визуального изучения внешних морфологических признаков имаго и их соответствия генотипу (маркерным мутациям), прописанному в каталоге коллекционных линий дрозофил.

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

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

Ответственность
Старший научный сотрудник, проводящий регулярную проверку соответствия коллекционных линий декларируемым признакам; руководитель коллекции.

Порядок действий

2.1. Взять пробирку с дрозофилами из линии, открыть ватную пробку и поместить мух в морилку с эфиром.
2.2. Держать мух в морилке в течение 10 -15 сек и высыпать их на предметный столик бинокулярной лупы.
2.3. Провести определение внешних морфологических признаков. Для поворота мух под нужным углом зрения используют пинцет (5 мин).

Периодичность

Регулярная проверка проводится один раз в два месяца.

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

СОП № 3
"Молекулярно-генетическая диагностика коллекционных линий дрозофил с редактированным геномом"

Применение
Процедура применима к организации контроля соответствия коллекционных линий заявленным изменениям генотипа.

Цель
Проверка коллекционных линий на возможную контаминацию путем анализа соответствия фрагмента гена с изменённой последовательностью ДНК реально заявленному уникальному образцу.

Определения

ПЦР – полимеразная цепная реакция.
Секвенирование – определение последовательности ДНК маркерного локуса с целью идентификации его принадлежности уникальному редактированному образцу.

Список литературы
Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R., 1994, DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates //Mol Mar Biol Biotechnol. V. 3., № 5., 294-299

Ответственность
Научный сотрудник

Последовательность действий

4.1. Выделение тотальной ДНК осуществляют стандартными методами из 10 взрослых дрозофил.
4.2. Пробирку с ДНК оставляют на хранение при t = -20°C.
4.3. Часть ДНК используют для ПЦР и секвенирования.
4.3.1. ПЦР проводят по стандартной методике с праймерами для конкретного гена или конструкции, в соответствии с местом локализации его маркерной последовательности.
4.3.2. Проводят секвенирование ПЦР-продукта.
4.4. Полученную последовательность сравнивают с имеющимися в базе данных NCBI BLAST для определения локализации, а также с внутренней базой данных последовательностей для установления соответствия ДНК образца заявленной линии.
4.5. Данные о результатах анализа линейной принадлежности заносят в электронный каталог коллекции.

Периодичность
Анализ проводят 1 раз в 2 года или при подозрении на контаминацию.

Пересмотр СОП

Пересмотр СОП осуществляется 1 раз в год, в связи с пополнением коллекции новыми линиями.

СОП №4
"Пополнение коллекционных фондов новыми линиями дрозофил с редактированным геномом"

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

Цель
Обеспечение безопасного пополнения коллекционных линий дрозофил, недопущение привнесения бактериального или иного заражения в основной фонд путем совершения карантинных мероприятий.

Определения
Линия – коллекционная культура дрозофил определенного вида с указанным генотипом и/или фенотипом.
Кормовая среда – изготавливаемая по стандартной методике пищевая смесь для содержания дрозофил.
Посев – перенос имаго дрозофил на новую кормовую среду.

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; научный сотрудник, проводящий регулярную проверку соответствия коллекционных линий декларируемым признакам; руководитель коллекции.

Порядок действий
5.1. В случае поступления новых линий проводят их изучение с целью подтверждения их фенотипа/генотипа заявленному.
5.2. Проводят сбор информации о генотипе дрозофил линии, которая заносится в список линий коллекции.
5.3. После этого осуществляют карантин для новых линий дрозофил в течение одного поколения мух. Визуально по цвету кормовой среды в пробирках проверяют наличие или отсутствие бактериального, или иного заражения, под бинокулярной лупой определяют наличие заражения клещами. Карантин проводят в отдельном помещении, в удалении от основной коллекции. При необходимости осуществляют дополнительный посев мух на свежий корм. После вылета нового поколения дрозофил из куколок при условии отсутствия клещей в пробирках и бактериального заражения корма можно перемещать эти линии из карантина в основной коллекционный фонд.
5.4 Пересев линий при содержании в карантине осуществляют в соответствии с СОП-1. Подготовка кормовой среды для ловушек и для ведения линий осуществляется в соответствии с СОП-5.

Периодичность

СОП осуществляется в случае необходимости.

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

СОП № 5
"Приготовление кормовой среды для коллекции дрозофил"

Применение
Процедура применима к организации процесса поддержания коллекционных линий дрозофил на этапе подготовки материалов.

Цель
Организация процесса приготовления кормовой среды для содержания и разведения коллекционных линий дрозофил.

Определения
Стакан – плоскодонный цилиндрический стеклянный стакан или пробирка многоразового использования объемом 10, 30 и 100 мл.
Линия – коллекционная культура дрозофил с указанным генотипом и/или фенотипом.
Единица хранения – индивидуальная линия дрозофил коллекции.
Кормовая среда – изготавливаемая по стандартной методике пищевая смесь для содержания дрозофил.

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

Ответственность
Лаборант

Последовательность действий
6.1. Кормовая среда для коллекционных линий дрозофил имеет следующий состав: вода – 1 л; сахар ГОСТ 21-94 - 40 г (или мальтозная патока - 60 мл); пекарские дрожжи ГОСТ Р 54731-2011 – 70 г (или сухие дрожжи ГОСТ Р 54845-2011 - 18 г); изюм ГОСТ 6882-88 – 40 г.; манная крупа ГОСТ 7022-2019 – 35 г; агар-агар ГОСТ 16280-2002 – 7 г; пропионовая кислота ГОСТ 32746-2014 – 2 мл. Кормовую среду готовят в алюминиевой емкости объемом 5 л, исходя из расчета на 3 л воды. Подготавливают навески ингредиентов.
6.2. К 3 л кипящей воды добавляют 120 г сахара, 54 г сухих дрожжей и 40 г измельченного изюма. Смесь варят на небольшом огне в течение 40 мин.
6.3. К кипящей смеси аккуратно добавляют 110 г манной крупы при постоянном помешивании во избежание образования комков.
6.4. Через 10 мин при постоянном помешивании добавляют 20 г агар-агара и варят еще 10 мин.
6.5. Смесь следует остудить до 60-70° С после чего добавить пропионовую кислоту в объеме 6 мл.
6.6. Смесь разливают по используемым ёмкостями слоем около 1,5 - 2 см в соответствии с количеством заказанных стаканов. Неиспользованную остывшую смесь хранят при 4° С в течение одной недели.
6.7. Стаканы со свежей кормовой средой оставляют остывать в течение 2х часов, накрыв их стерильной марлей.
4.8. После испарения конденсата со стенок стаканов они могут быть закрыты стерильными ватными пробками. Особое внимание уделяется контролю прилегания ватной пробки к стенкам стакана. В таком виде стаканы могут быть использованы для пересадки дрозофил

или оставлены на хранение в течение 1 недели при 4^{0} С.

Периодичность
СОП выполняется 1 – 2 раза в неделю.

Пересмотр СОП
Пересмотр СОП осуществляется 1 раз в год, в связи с оптимизацией состава кормовой смеси.

СОП № 6
"Обработка отработанной посуды и подготовка к дальнейшему использованию"

Применение
Процедура применима к организации процесса поддержания коллекционных линий дрозофил на этапе подготовки материалов.

Цель
Организация кругооборота емкостей для содержания и разведения коллекционных линий дрозофил.

Определения
Стакан – плоскодонный цилиндрический стеклянный или пластиковый стакан или пробирка многоразового использования объемом 10, 30 и 100 мл.
Линия – коллекционная культура дрозофил с указанным генотипом и/или фенотипом.
Единица хранения – индивидуальная линия дрозофил коллекции.
Кормовая среда – изготавливаемая по стандартной методике пищевая смесь для содержания дрозофил.

Ответственность
Лаборант

Последовательность действий
7.1. Отработанные стаканы освобождают от ватных пробок и живых имаго. Имаго утилизируют в растворе детергента.
7.2. Ватные пробки также стерилизуют в автоклаве.
7.3. Стаканы погружают в емкость, заливают 0,2% раствором каустической соды (около 20–25 г NaOH на ведро) и нагревают до кипения.
7.4. Органические остатки удаляют со стенок стаканов механически при помощи ершика.
7.5. Стаканы ополаскивают проточной водой 2 раза.
7.6. Для дезинфекции стаканы обрабатывают сухим жаром в сушильном шкафу при t-120° С в течение 2х часов.
7.7. Готовые стаканы ставят в алюминиевые лотки. Для длительного хранения стаканы ставятся на лотки вверх дном или тщательно укрываются бумагой.
7.8. Деревянные лотки, бывшие в употреблении, моют горячей водой и периодически дезинфицируются слабым раствором соды.

Периодичность
СОП выполняется 1 – 2 раза в неделю.

Пересмотр СОП
Пересмотр СОП осуществляется 1 раз в год, в связи с изменением объема работы и оптимизацией процесса.