|  |
| --- |
| ФГБНУ ЯНЦ КМП |
| СОП №\_\_\_\_\_\_ от 03.04.2023 | Стандартная операционная процедураПостановка ПДРФ анализа |
| Цель СОП: | Данная стандартная операционная процедура описывает правила постановки ПДРФ анализа |
| Разработчик: | Павлова Н.И.  |
| Рабочее место: | Лаборатория наследственной патологии |
| Утверждено: | Кононова С.К. |

**Техника постановки ПДРФ анализа**

***Первый день проведения ПДРФ анализа.***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Описание операции | Время выполнения на 10 образцов | Используемые материалы и приборы |
| 1 | Из шкафа документации взять паспорт изучаемого полиморфизма находящегося в папке № 7 (Приложение 1.) | 30 минут | Халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные, нитриловые перчаткиЛаминарный бокс БАВ-01 – «Ламинар-СХолодильник или морозильная камера, штатив для пробирок |
| 2 | Составить протокол проведения ПДРФ (Приложение 2) с помощью Паспорта полиморфизма. |
| 3 | Заполнить протокол согласно инструкции по заполнению протокола (Приложение 3). |
| 4 | Надеть соответствующую форму одежды (халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные). Провести гигиеническую антисептику рук и надеть перчатки, предварительно проверив их на целостность.  |
| 5 | Обработать поверхности (рабочий стол, пинцет, полуавтоматические пипетки) 70-ти процентным этиловым спиртом, ветошью меняя по мере необходимости. Использованные ветоши поместить в пластиковый контейнер для сбора и дезинфицирующей обработки расходных материалов, перчаток и ветоши. |
| 6 | Включить ламинарный бокс БАВ-01 – «Ламинар-С». Обработать поверхности (рабочий стол, пинцет, полуавтоматические пипетки) 70-ти процентным этиловым спиртом, ветошью меняя по мере необходимости. Использованные ветоши поместить в пластиковый контейнер для сбора и дезинфицирующей обработки расходных материалов, перчаток и ветоши.  |
| 7 | Включить термостат в сеть с помощью сетевой вилки. Включить переключатель «СЕТЬ» (находится на панели снизу термостата) при этом на цифровом табло панели управления, находящейся на двери термостата высвечивается текущая температура в камере термостата. Нажатием кнопки устанавливаем температуру в соответствии с паспортом рестриктазы. |
| 8 | Взять пластиковый штатив для микроцентрифужных пробирок и подойти к месту хранения амплификатов (холодильник номер 7, либо морозильник номер 3). Взять необходимые пробирки с амплификатом и разместить их в штативе слева направо, начиная со второго ряда. |
| 9 | Взять из морозильной камеры для реактивов (номер 4) соответствующий буфер для рестриктазы и деионизированную воду. |
| 10 | Все дальнейшие манипуляции проводятся в ламинарном боксе БАВ-01 – «Ламинар-С». |
| 11 | Штатив с микроцентрифужными пробирками с амплификатом и буфером поставить на рабочий стол слева от себя и оставить их на 5 мин при комнатной температуре до полного размораживания. Не допускается ставить пробирки с амплификатом рядом с нагревательными приборами, под прямыми лучами солнца и при включенной UV-лампе!  | 5 мин |  |
| 12 | Записать дату, номера пробирок с амплификатом и протокол в Журнал проведения ПЦР анализа | 5 мин |  |
| 13 | С помощью стерильного пинцета из соответствующего зип пакета вынуть тонкостенные пробирки, и расставить их в штативы слева направо, начиная со второго ряда, маркируя соответствующим шифром. После оттаивания реактивов, готовим микс, строго следуя протоколу паспорта полиморфизма. Рестриктаза хранится при -20°С, ее добавляют в микс в последнюю очередь. ВАЖНО! При постановке большего количества образцов ДНК, во избежании потерь объема и активности микса во время раскапывания, необходимо готовить несколько миксов с расчетом на 10 образцов, либо один микс с прибавкой каждого реактива на 25%.  | 10 мин | Пробирки объемом 0,2 мл (при большом количестве образцов можно использовать стрипы пробирок или 96 луночные плашки, соответственно крышки для стрипов и пленку для заклеивания плашек), одноканальные пипетки до 10 мкл, до 100 мкл, наконечники к ним, штатив для пробирок 0,2 мкл.Холодильник или морозильная камера,штатив для пробирок.Центрифуга-вортекс, настольная центрифуга, подставка под плашки/стрипы |
| 14 | Все использованные реактивы помещаем обратно в морозильную камеру для реактивов (морозильник номер 4).ВАЖНО! Во избежание потери единиц активности реактивов необходимо сразу помещать их морозильную камеру, во время подготовки миксов быть предельно внимательными.  |
| 15 | Смесь микса перемешивают на вортексе в течении 2 сек. Затем для осаждения капель, центрифугируют в течении 2-3 сек. Затем микс раскапываем в подготовленные тонкостенные пробирки с помощью дозатора.ВАЖНО! Не следует превышать время раскапывания микса более чем 30 мин.  |
| 16 | В подготовленные пробирки с помощью дозатора добавляют амплификат объемом 7 мкл.ВАЖНО! Во избежание ложноположительных и ложноотрицательных результатов, для каждого образца использовать новый наконечник с фильтром к полуавтоматическим пипеткам.  | 10 мин | Одноканальные пипетки до 10 мкл, до 100 мкл, наконечники к ним, штатив для пробирок 0,2 мклЦентрифуга-вортекс, настольная центрифуга, подставка под плашки/стрипы |
| 17 | Смесь микса с амплификатом перемешивают на вортексе в течении 2 сек. Затем для осаждения капель, центрифугируют в течении 2-3 сек.  |
| 18 | Помещаем пробирки в термостат при заданной температуре в зависимости от рестриктазы. |
| 19 | Время инкубирования амплификатов в термостате, зависит от рестриктазы и составляет от 3 до 16 часов. | До 16 часов |  |
| 20 | Производим уборку рабочего места с применением дезинфицирующих средств. Использованные пробирки, наконечники для дозаторов и медицинские перчатки, помещаются в биологически безопасный контейнер с дезинфицирующим раствором. Обработать рабочую поверхность 70% спиртом и протереть одноразовым полотенцем. Включить УФ бактерицидную лампу на 10 минут. | 10 мин | Халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные, нитриловые перчатки |
| 21 | Выполните гигиену рук, согласно стандарту мытья рук.  |

***Второй день проведения ПДРФ анализа***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Описание операции | Время выполнения на 10 образцов | Используемые материалы и приборы |
| 1 | Надеть соответствующую форму одежды (халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные). Провести гигиеническую антисептику рук и надеть перчатки, предварительно проверив их на целостность.  | 10 мин |  |
| 2 | Обработать поверхности (рабочий стол, пинцет, полуавтоматические пипетки) 70-ти процентным этиловым спиртом, ветошью меняя по мере необходимости. Использованные ветоши поместить в пластиковый контейнер для сбора и дезинфицирующей обработки расходных материалов, перчаток и ветоши. |
| 3 | В комнате для проведения электрофореза, подготовить реактивы для гель-электрофорезного анализа рестриктатов. | До 1 часа | Дистиллированная вода, ТАЕх50, мерный цилиндрЛабораторный журналТАЕх1, агароза, термостабильная колбаМикроволновая печьБромистый этидийЗаливочная камера, гребенкиХолодильник или морозильная камера, штатив для пробирок, штатив, буфер для внесения проб (6X loading buffer) и маркер длин. |
| 4 | Приготовить буфер ТАЕ для электрофореза разведением стокового раствора ТАЕх50. Для приготовления 1л буфера ТАЕ необходимо взять 20 мл стокового раствора ТАЕх50 и довести до литра дистиллированной водой. |
| 5 | В журнале проведения электрофореза фиксируются дата, исследуемый тип образцов (амплификат), шифр исследуемых пробирок, процент геля. |
| 6 | Процентность агарозного геля подбирается в зависимости от размера исследуемого рестриктата (см. паспорт полиморфизма). Для приготовления геля необходимо взвесить в зависимости от процента геля агарозу и добавить 1ХТАЕ буфер до 100 мл. |
| 7 | Смешать агарозу и буферный раствор ТАЕ. Используйте термостабильную колбу, которая в несколько раз превышает объем приливаемого буфера.  |
| 8 | Включите микроволновую печь. Аккуратно перемешивайте агарозу при нагревании, чтобы она полностью растворилась.ВАЖНО! Будьте осторожны при приготовлении раствора агарозы, при высокой температуре раствор сильно кипит. |
| 9 | Растворенную агарозу необходимо охладить до (≈600С), после чего добавить 5 мкл бромистого этидия. ВАЖНО! Бромистый этидий – сильный мутаген. Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках.Приготовленный гель агарозы перенести в заливочную камеру. Избегайте образования пузырьков воздуха! Вертикально вставьте гребенку. Гребенка должна быть погружена в раствор агарозы. |
| 10 | Расплавленная агароза при остывании полимеризуется, образуя гель (15-45 минут). Об образовании геля можно судить по его внешнему виду. После застывания геля осторожно удалить гребенку, покачав ее из стороны в сторону и потянув вверх.  |
| 11 | Из морозильной камеры (номер 4) достать буфер для внесения проб (6X loading buffer) и маркер длин. |
| 12 | Достаньте из термостата штатив с пробирками рестриктата. |
| 13 | Поместите подложку с агарозным гелем в камеру для электрофореза, при этом лунки должны находиться на стороне катода. Так как ДНК имеет отрицательный заряд, то рестрикты движутся от катода (-) к аноду (+). |
| 14 | Добавить в камеру для проведения электрофореза буферный раствор ТАЕ, который был использован при приготовлении агарозного геля. При этом буферный раствор должен покрывать гель не менее 1 см. | Электрофорезная камера, ТАЕх1 |
| 15 | Подготовить рестрикты для детекции. В плашке смешать: 1 мкл буфера для внесения проб (6X loading buffer) и 5 мкл рестрикта.ВАЖНО! В плашку сперва, раскапать одним носиком буфер для внесения проб. Затем вносить рестрикт. Во избежание ложных результатов, для каждого образца рестрикта использовать новый наконечник к полуавтоматическим пипеткам. | От 10 мин | Одноканальные пипетки до 10 мкл, наконечники к ним, буфер для нанесения (6x loading buffer) и маркер длин (step100)Электрофорезная камера, источник питания «Эльф-4». |
| 16 | Использование молекулярного маркера позволяет определить размер рестрикта. Подготовить маркер длин. В плашке смешать: 1 мкл буфера для внесения проб (6X loading buffer), 4 мкл ионизированной воды, 1 мкл ДНК маркер.  |
| 17 | Взять пипеточный одноканальный дозатор объемом 10 мкл, убедиться, что посадочный конус не загрязнен, установить наконечник до 6 мкл. Наконечник должен быть герметично присоединен к посадочному конусу. Набрать приготовленную пробу образца. |
| 18 | Аккуратно помесите наконечник пипетки в лунку геля (так, чтобы не повредить карман и дно геля) и медленно внесите пробу.ВАЖНО! Во избежание ложноположительных результатов, для каждого образца использовать новый наконечник к полуавтоматическим пипеткам.  |
| 19 | Закрыть крышкой камеру для проведения электрофореза, после чего подсоединить электрические провода к источнику питания. Убедитесь, что провода присоединены правильно - амплификат мигрирует к аноду (красный), установить режим на 100-120В. При включении питания, пузыри должны формироваться на электродах, расположенных в электрофорезной камере. | От 30 мин |
| 20 | После включения источника питания убедитесь, что движение рестрикта в геле происходит в правильном направлении. Визуализация разделения осуществляется за счет бромфенолового синего. |
| 21 | Время проведения электрофореза зависит от размера рестрикта и составляет в среднем 20-30 мин., отключите ток, отсоедините провода и снимите крышку электрофоретической камеры. Переместите гель на фильтр УФ камеры. |
| 22 | С помощью системы видеодокументации получить фотографию геля в проходящем УФ-свете при длине волны 260 нм.  | От 10 мин | Трансиллюминатор, темная комната для трансиллюминаторов типа TFX, блок управления гельдокументирующей системы. Блок управления гельдокументирующей системы BioProfil. |
| 23 | Записать результаты в журнал протокола ПЦР и в журнале проведения электрофореза, указать в них название файла фотографии электрофореограммы.  |
| 24 | Использованный гель и расходный материал помесить в пластиковый контейнер для сбора и дезинфицирующей обработки расходных материалов, перчаток и ветоши.  |
| 25 | Обработать поверхности (рабочий стол, пинцет, полуавтоматические пипетки) 70-ти процентным этиловым спиртом, ветошью меняя по мере необходимости. Использованные ветоши поместить в пластиковый контейнер для сбора и дезинфицирующей обработки расходных материалов, перчаток и ветоши.ВАЖНО! После каждого выполненного этапа работы сверять свои действия по СОП, во избежание отклонения от СОП. Следить за своевременной подготовкой и уборкой реактивов. | От 5 мин | Халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные, нитриловые перчатки |

***Основное оборудование:***

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Наименование | Балансодержатель | Инвентарный номер | Доля единовременной загрузки оборудования при выполнении СОП, от 0 до 1 | Время полезного использования при выполнении СОП, мин. | Годовая норма времени работы оборудования, мин. |
| 1 | Микроволновая печь Mystery MMW 2025 |   |   |   |   |   |
| 2 | БАВ-ПЦР – «Ламинар-С», Бокс для ПЦР- диагностики, таймер, УФО, две розетки | ЯНЦ КМП | М000000670 |  0,38  |  93,40  |  23 069,80  |
| 3 | Микроцентрифуга – вортекс «Микроспин» 2400 об/мин FV -2400 | ЯНЦ КМП | М000000302 |  0,00  |  0,03  |  118 560,00  |
| 4 | Термостат  | ЯНЦ КМП | М000000585 |  0,91  |  960,00  |  118 560,00  |
| 5 | Электрофоретическая камера | ГАУ Технопарк "Якутия" |   |   |   |   |
| 6 | Источник питания Эльф-4 | ГАУ Технопарк "Якутия" |   |   |   |   |
| 7 | Аналоговая монохромная камера для BioPrint (Viber Lourmat)  | ЯНЦ КМП  | H0001300109 |  0,08  |  5,00  |  1 235,00  |
| 8 | Объектив 12,5\*75/1,8 с линзами 1D для BioPrint (Viber Lourmat)  | ЯНЦ КМП  | H0001300100 |  0,08  |  5,00  |  1 235,00  |
| 9 | CN-TFX, темная комната для трансиллюминаторов типа TFX  |  ЯНЦ КМП  | H0001300111 |  0,08  |  5,00  |  1 235,00  |
| 10 | Блок управления гельдокументирующей системы BioProfil  |  ЯНЦ КМП  | H0001300113 |  0,08  |  5,00  |  1 235,00  |
| 11 | Трансиллюминатор TFX-20. C (Viber Lourmat), 254 нм  |  ЯНЦ КМП  | H0001300112 |  0,08  |  5,00  |  1 235,00  |

***Вспомогательное оборудование:***

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | Наименование | Кол-во |
|  | Лабораторный рабочий стол | 1 |
|  | Лабораторные стулья с поверхностями, подлежащими обработке дезинфицирующими средствами | 2 |

***Расходные материалы и реактивы:***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Наименование |  | Кол-во |
| 11 | Халат лабораторный, хирургический костюм |  шт.  | 0,01 |
| 22 | Перчатки медицинские смотровые нитриловые |  шт.  | 2 |
| 33 | Наконечник до 20 мкл |  шт.  | 5 |
| 44 | Наконечник до 10 мкл |  шт.  | 4 |
| 55 | Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечникам и на 1-10 мкл типа "Ленпипет" |  шт.  | 0,01 |
| 66 | Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечникам и на 20-200 мкл типа "Ленпипет" |  шт.  | 0,01 |
| Реактивы для рестрикции |
| 1 | Рестриктаза |  мкл.  | 0,1 |
| 2 | Вода |  мкл.  | 10,9 |
| Реактивы для проведения электрофореза |
| 1 | 50xTAE-буфер |  мл  | 10 |
| 2 | Агароза |  гр  | 2 |
| 3 | Бромистый этидий |  мкл  | 5 |