|  |  |
| --- | --- |
| ФГБНУ ЯНЦ КМП | |
| СОП №\_\_\_\_\_\_ от 03.04.2023 | Стандартная операционная процедура  Постановка 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 перчатки  Ламинарный бокс БАВ-01 – «Ламинар-С  Холодильник 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 мкл  Центрифуга-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 цилиндр  Лабораторный журнал  ТАЕх1, агароза, термостабильная колба  Микроволновая печь  Бромистый этидий  Заливочная камера, гребенки  Холодильник 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 |