|  |  |
| --- | --- |
| ФГБНУ ЯНЦ КМП | |
| СОП №\_\_\_\_\_\_ от 03.04.2023 | Стандартная операционная процедура  Постановки ПЦР |
| Цель СОП: | Данная стандартная операционная процедура описывает правила проведения полимеразной цепной реакции для амплификации ДНК образцов. |
| Разработчик: | Павлова Н.И. |
| Рабочее место: | Лаборатория наследственной патологии |
| Утверждено: | Кононова С.К. |

**Правила проведения полимеразной цепной реакции для амплификации ДНК образцов.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Описание операции | Время выполнения на 10 образцов | Используемые материалы и приборы |
| 1 | Из шкафа документации взять паспорт изучаемого полиморфизма, находящегося в папке № 7. | 30 мин |  |
| 2 | Составить протокол проведения ПЦР, с помощью Паспорта полиморфизма. |
| 3 | Заполнить протокол согласно инструкции по заполнению протокола. |
| 4 | Надеть соответствующую форму одежды (халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные). Провести гигиеническую антисептику рук и надеть перчатки, предварительно проверив их на целостность. | Халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные, нитриловые перчатки |
| 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. | Ламинарный бокс БАВ-01 – «Ламинар-С |
| 7 | Взять пластиковый штатив для микроцентрифужных пробирок и подойти к морозильнику (номер 6) Открыть нужный отсек морозильника (нельзя держать морозильник открытым более трех минут) и взять необходимые пробирки с аликвотами ДНК. Разместите их в штативе слева направо, начиная со второго ряда. | Холодильник или морозильная камера,  штатив для пробирок |
| 8 | Взять из морозильной камеры для ПЦР реактивов (номер 4) соответствующие праймеры, буфер для полимеразы, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и деионизированную воду. |
| 9 | Все дальнейшие манипуляции проводятся в ламинарном боксе БАВ-01 – «Ламинар-С». | | |
| 10 | Штатив с микроцентрифужными пробирками с аликвотами ДНК и ПЦР реактивами поставить на рабочий стол слева от себя и оставить их на 15 мин при комнатной температуре до полного размораживания. Не допускается ставить пробирки с ДНК рядом с нагревательными приборами, под прямыми лучами солнца и при включенной UV-лампе! | 15 мин |  |
| 11 | С помощью стерильного пинцета из соответствующего зип пакета вынуть тонкостенные пробирки для ПЦР, и расставить их в штативы для ПЦР пробирок слева направо, начиная со второго ряда, маркируя соответствующим шифром. | 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 |
| 12 | После оттаивания реактивов, готовим микс, строго следуя протоколу паспорта полиморфизма. Taq-полимераза храниться 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%. |
| 13 | 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. | Холодильник или морозильная камера,  штатив для пробирок |
| 14 | 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 для ПЦР с помощью дозатора.  ВАЖНО! Не следует превышать время раскапывания микса более чем 30 мин. | Центрифуга-вортекс, настольная центрифуга, подставка под плашки/стрипы |
| 15 | В каждую тонкостенную пробирку для ПЦР с миксом добавляют аликвоту ДНК объемом 1 мкл.  ВАЖНО! Во избежание контаминации, для каждого образца использовать новый наконечник к полуавтоматическим пипеткам. | 10 мин | Одноканальные пипетки до 10 мкл, до 100 мкл, наконечники к ним, штатив для пробирок 0,2 мкл |
| 16 | Смесь микса с аликвотой перемешивают на вортексе в течении 2 сек. Затем для осаждения капель, центрифугируют в течении 2-3 сек. | Центрифуга-вортекс, настольная центрифуга, подставка под плашки/стрипы |
| 17 | Включить Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот MJ MiniCycler и поместить тонкостенные пробирки для ПЦР со смесью. | 3 мин | Амплификатор |
| 18 | Установить температурный режим амплификации, в соответствии с протоколом полиморфизма. Затем запустить программу. |

Время проведения амплификации зависит от количества циклов. В среднем занимает от 1 до 3 часов.

ВАЖНО! Чтобы удостовериться, что амплификация прошла успешно, необходимо проверить амплификаты гель-электрофорезным методом.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 20 | В комнате для проведения электрофореза, за 30 минут до окончания амплификации, необходимо подготовить реактивы для гель-электрофорезного анализа амплификатов. | До 1 часа |  |
| 21 | 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. | Дистиллированная вода, ТАЕх50, мерный цилиндр |
| 22 | В журнале проведения электрофореза фиксируются дата, исследуемый тип образцов (амплификат), шифр исследуемых пробирок, процент геля. | Лабораторный журнал |
| 23 | Процентность агарозного геля подбирается в зависимости от размера исследуемого амплификата (см. паспорт полиморфизма). Для приготовления геля необходимо взвесить в зависимости от процента геля агарозу и добавить 1ХТАЕ буфер до 100 мл. | ТАЕх1, агароза, термостабильная колба |
| 24 | Смешать агарозу и буферный раствор ТАЕ. Используйте термостабильную колбу, которая в несколько раз превышает объем приливаемого буфера. |
| 25 | 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. | Микроволновая печь |
| 26 | 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. | Бромистый этидий |
| 27 | Приготовленный гель агарозы перенести в заливочную камеру. Избегайте образования пузырьков воздуха! Вертикально вставьте гребенку. Гребенка должна быть погружена в раствор агарозы. | Заливочная камера, гребенки |
| 28 | 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. |  |
| 29 | Из морозильной камеры (номер 4) достать буфер для внесения проб (6X loading buffer) и маркер длин. | Холодильник или морозильная камера, штатив для пробирок |
| 30 | После окончания амплификации вытащить из термоциклера пробирки с амплификатом и разместить их в штативе слева направо, начиная со второго ряда. Отнести штатив с пробирками амплификатов в комнату для электрофореза. | штатив для пробирок |
| 31 | Поместите подложку с агарозным гелем в камеру для электрофореза, при этом лунки должны находиться на стороне катода. Так как ДНК имеет отрицательный заряд, то амплификаты движутся от катода (-) к аноду (+). | Электрофорезная камера, ТАЕх1 |
| 32 | 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. |
| 33 | Подготовить амплификаты для детекции. В плашке смешать: 1 мкл буфера для внесения проб (6X loading buffer) и 5 мкл амплификата.  ВАЖНО! В плашку сперва, раскапать одним носиком буфер для внесения проб. Затем вносить амплификат. Во избежание ложноположительных результатов, для каждого образца амплификата 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) |
| 34 | Использование молекулярного маркера позволяет определить размер амплификата. Подготовить маркер длин. В плашке смешать: 1 мкл буфера для внесения проб (6X loading buffer), 4 мкл ионизированной воды, 1 мкл ДНК маркера. |
| 35 | 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. |
| 36 | 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. |
| 37 | 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. | 30 мин | Электрофорезная камера, источник питания «Эльф-4» |
| 38 | После включения источника питания убедитесь, что движение амплификата в геле происходит в правильном направлении. Визуализация разделения осуществляется за счет бромфенолового синего. |
| 39 | Если ПДРФ анализ планируется в этот же день, то штатив с пробирками амплификата поместить в холодильник (номер 7). Если ПДРФ анализ планируется провести в другой день, то аликвоты помещают в морозильник (номер 3). | Холодильник или морозильная камера |
| 40 | Время проведения электрофореза зависит от размера амплификата и составляет в среднем 20-30 мин., отключите ток, отсоедините провода и снимите крышку электрофоретической камеры. Переместите гель на фильтр УФ камеры. | Трансиллюминатор, темная комната для трансиллюминаторов типа TFX, блок управления гельдокументирующей системы Блок управления гельдокументирующей системы BioProfil |
| 41 | С помощью системы видеодокументации получить фотографию геля в проходящем УФ-свете при длине волны 260 нм. | 10 мин |
| 42 | Записать результаты в журнал протокола ПЦР и в журнале проведения электрофореза, указать в них название файла фотографии электрофореограммы. | Лабораторный журнал |
| 43 | Использованный гель помесить в пластиковый контейнер для сбора и дезинфицирующей обработки расходных материалов, перчаток и ветоши. | Халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные, нитриловые перчатки |
| 44 | 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 выполненого этапа работы сверять свои действия по СОП, во избежание отклонения от СОП. Следить за своевременной подготовкой и уборкой реактивов. | От 5 мин |

***Оборудование:***

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Наименование | Балансодержатель | Инвентарный номер | Доля единовременной загрузки | Время полезного использования | Годовая норма времени работы |
|  | Микроволновая печь |  |  |  |  |  |
|  | БАВ-ПЦР – «Ламинар-С», Бокс для ПЦР- диагностики, таймер, УФО, две розетки | ЯНЦ КМП | М000000670 | 0.38 | 93.40 | 23 069.80 |
|  | Микроцентрифуга – вортекс «Микроспин» 2400 об/мин FV -2400 | ЯНЦ КМП | М000000302 | 0.00 | 0.03 | 118 560.00 |
|  | Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот MJ MiniCycler | ЯНЦ КМП | М000000479 | 0.61 | 150.00 | 37 050.00 |
|  | Мини-камера для горизонтального электрофореза SE-1 | ГАУ Технопарк "Якутия" |  |  |  |  |
|  | Источник питания Эльф-4 | ГАУ Технопарк "Якутия" |  |  |  |  |
|  | Трансиллюминатор TFX -20. C (Viber Lourmat), 254 нм | ЯНЦ КМП | H0001300109 | 0.08 | 5.00 | 1 235.00 |
|  | Аналоговая монохромная камера для BioPrint (Viber Lourmat) | ЯНЦ КМП | H0001300100 | 0.08 | 5.00 | 1 235.00 |
|  | Объектив 12,5\*75/1,8 с линзами 1D для BioPrint (Viber Lourmat) | ЯНЦ КМП | H0001300111 | 0.08 | 5.00 | 1 235.00 |
|  | CN-TFX, темная комната для трансиллюминаторов типа TFX | ЯНЦ КМП | H0001300113 | 0.08 | 5.00 | 1 235.00 |
|  | Блок управления гельдокументирующей системы BioProfil | 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 личные средства защиты:***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Наименование | Единица измерения | Израсходовано единиц |
| 1 | Халат лабораторный, хирургический костюм, шт | шт | 0,01 |
| 2 | Перчатки медицинские смотровые нитриловые, шт | пара | 2 |
| 3 | Наконечник до 20 мкл, шт. | шт | 11 |
| 4 | Наконечник до 10 мкл, шт. | шт | 9 |
| 5 | пробирка 0,25 мл, шт. | шт | 2 |
| 6 | dNTP, мкл | мкл | 2,5 |
| 7 | Праймер, мкл | мкл | 1 |
| 8 | Праймер, мкл | мкл | 0,5 |
| 9 | Вода, мкл | мкл | 0,5 |
| 10 | Taq полимераза, мкл | мкл | 15 |
| 11 | 50xTAE-буфер, мл | мл | 10 |
| 12 | Агароза, г | гр | 2 |
| 13 | Бромистый этидий, мкл | мкл | 5 |
| 14 | Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками на 1-10 мкл типа "Ленпипет", (на 100 ед.хр.) | шт. | 0,01 |
| 15 | Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками на 20-200 мкл типа "Ленпипет", (на 100 ед.хр.) | шт. | 0,01 |