|  |  |
| --- | --- |
| ФГБНУ ЯНЦ КМП | |
| СОП №\_\_\_\_\_\_ от 03.04.2023 | Стандартная операционная процедура  Правила проведения гель – электрофореза |
| Цель СОП: | Данная стандартная операционная процедура описывает правила проведения гель – электрофореза |
| Разработчик: | Павлова Н.И. |
| Рабочее место: | Лаборатория наследственной патологии |
| Утверждено: | Кононова С.К. |

**Правила проведения гель – электрофореза**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | 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 (см. Приложение 2) и надеть перчатки, предварительно проверив их на целостность. | 5 мин | Халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные, нитриловые перчатки |
| 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 | 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 мин | 50хТАЕ, дистиллированная вода, мензурка |
| 4 | Включить весы. Взвесить 1 г агарозы. | 5 мин | Агароза, весы, термостабильная колба, микроволновая печь, бромистый этидий, заливочная камера |
| 5 | Смешать агарозу и буферный раствор ТАЕ. Используйте термостабильную колбу, которая в несколько раз превышает объем приливаемого буфера. |
| 6 | Включите микроволновую печь. Аккуратно перемешивайте агарозу при нагревании, чтобы она полностью растворилась.  *Внимание!* *Будьте осторожны при приготовлении раствора агарозы, при высокой температуре раствор сильно кипит*. |
| 7 | Растворенную агарозу необходимо охладить до (≈600С), после чего добавить 5 мкл бромистого этидия.  *Предостережение! Бромистый этидий – сильный мутаген. Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках*. |
| 8 | Приготовленный гель агарозы перенести в заливочную камеру. Избегайте образования пузырьков воздуха! Вертикально вставьте гребенку. Гребенка должна быть погружена в раствор агарозы. |
| 9 | Расплавленная агароза при остывании полимеризуется, образуя гель (30-45 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. | | |
| 10 | Взять пластиковый штатив для хранения пробирок и подойти к низкотемпературному морозильнику (номер1). Открыть нужный отсек морозильника (*нельзя держать морозильник открытым более трех минут*) и взять необходимые пробирки с ДНК. | | |
| 11 | Поместите подложку с агарозным гелем в камеру для электрофореза, при этом лунки должны находиться на стороне катода. ДНК движется от катода (-) к аноду (+). | 2 мин | Электрофорезная камера, буферный раствор 1хТАЕ |
| 12 | 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. |  |
| 13 | Подготовить образцы ДНК для детекции. В плашке смешать: 2 мкл буфера для внесения проб (6X loading buffer), 2 мкл ионизированной воды и 1 мкл образца ДНК. | 5 мин | Дозатор, наконечники, буфер для нанесения, ионизированная вода |
| 14 | Использование молекулярного маркера позволяет определить примерный размер ДНК. Подготовить ДНК маркер. В плашке смешать: 2 мкл буфера для внесения проб (6X loading buffer), 4 мкл ионизированной воды, 1 мкл ДНК маркер. | 2 мин |
| 15 | Взять пипеточный одноканальный дозатор объемом 10 мкл, убедиться, что посадочный конус не загрязнен, установить наконечник до 10 мкл. Наконечник должен быть герметично присоединен к посадочному конусу. Набрать приготовленную пробу ДНК. | 5 мин |
| 16 | Аккуратно помесите наконечник пипетки в лунку геля (так, чтобы не повредить карман и дно геля) и медленно внесите пробу. |
| 17 | Закрыть крышкой камеру для проведения электрофореза, после чего подсоединить электрические провода к источнику питания. Убедитесь, что провода присоединены правильно - ДНК мигрирует к аноду (красный). При включении питания, пузыри должны формироваться на электродах, расположенных в электрофорезной камере. | | |
| 18 | После включения источника питания убедитесь, что движение ДНК в геле происходит в правильном направлении. Визуализация разделения осуществляется за счет бромфенолового синего. | | |
| 19 | Взять штатив с пробиркой ДНК, отнести к морозильнику, открыть нужный отсек (*нельзя держать морозильник открытым более трех минут*) и поставить туда пробирку с ДНК. | | |
| 20 | По истечении 60 минут, отключите ток, отсоедините провода и снимите крышку электрофоретической камеры. Переместите гель на фильтр УФ камеры | До 1 часа | Гельдокументирующая система |
| 21 | С помощью системы видеодокументации получить фотографию геля в проходящем УФ-свете при длине волны 260 нм. | 5 мин |
| 22 | Записать результаты в журнал протокола детекции количества выделенного ДНК. |
| 23 | Использованный гель помесить в пластиковый контейнер для сбора и дезинфицирующей обработки расходных материалов, перчаток и ветоши. | 1 мин | Халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные, нитриловые перчатки, пластиковый контейнер |
| 24 | 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. | 5 мин |

### *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 | Весы лабораторные | ГАУ Технопарк "Якутия" |  |  |  |  |
| 2 | Микроволновая печь Mystery MMW 2025 |  |  |  |  |  |
| 3 | Электрофоретическая камера | ГАУ Технопарк "Якутия" |  |  |  |  |
| 4 | Лабораторный стол | ЯНЦ КМП | M000000255 | 1,00 | 60,00 | 118 560 |
| 5 | Лабораторный стул | ЯНЦ КМП | M000000256 | 1,00 | 60,00 | 118 560 |
| 6 | Блок питания | ГАУ Технопарк "Якутия" |  |  |  |  |
| 7 | Аналоговая монохромная камера для BioPrint (Viber Lourmat) | ЯНЦ КМП | H0001300109 | 0,08 | 5,00 | 1 235 |
| 8 | Объектив 12,5\*75/1,8 с линзами 1D для BioPrint (Viber Lourmat) | ЯНЦ КМП | H0001300100 | 0,08 | 5,00 | 1 235 |
| 9 | CN-TFX, темная комната для трансиллюминаторов типа TFX | ЯНЦ КМП | H0001300111 | 0,08 | 5,00 | 1 235 |
| 10 | Блок управления гельдокументирующей системы BioProfil | ЯНЦ КМП | H0001300113 | 0,08 | 5,00 | 1 235 |
| 11 | Трансиллюминатор TFX-20. C (Viber Lourmat), 254 нм | ЯНЦ КМП | H0001300112 | 0,08 | 5,00 | 1 235 |

### *Расходные материалы и реактивы:*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Наименование | Единица измерения | Израсходовано единиц |
| 1 | Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками на 1-10 мкл типа "Ленпипет", шт | шт. | 0,01 |
| 2 | Наконечник 10 мкл, шт | шт. | 5 |
| 3 | Штативы для 1,5 мл пробирок, шт | шт. | 0,01 |
| 4 | Перчатки смотровые нитриловые | пара | 1 |
| 5 | Cалфетка FIS Kim-Wipes - безворсовые салфетки (280 шт), упаковка | шт. | 4 |
| 6 | Маски медицинские одноразовые, шт | шт. | 1 |
| 7 | Халат медицинский, шт | шт. | 0,01 |
| 8 | Шапочка медицинская одноразовая, шт | шт. | 1 |
| 9 | Очки, шт | шт. | 0,01 |
| 10 | Лоток медицинский Контейнеры для дезинфекции и стерилизации КДСКронт 3 л. Срок службы – 3года. | шт. | 0,01 |
| 11 | Пинцет металлический анатомический | шт. | 0,01 |
| 13 | Термостабильная колба | шт. | 0,01 |
| 14 | Мензурка | шт. | 0,01 |
| 15 | Резиновая рукавица | шт. | 0,01 |
| 16 | Агароза, гр | гр | 1 |
| 17 | ТАЕх50, мл | мл | 10 |
| 18 | Спирт (этанол) 70%, мл | мл | 5 |
| 19 | Бромистый этидий, мкл | мкл | 5 |
| 20 | Планшет низкой сорбции | шт | 1 |
| 21 | Буфер для внесения проб (6X loading buffer ), мкл | мкл | 2 |
| 22 | Ионизированная вода, мкл | мкл | 3,00 |