|  |  |
| --- | --- |
| **ФГБНУ ЯНЦ КМП** | |
| СОП № от -3.04.2023 | Стандартная операционная процедура  **«ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО**  **КРИОХРАНЕНИЯ»** |
| Цель СОП | Определяет порядок подготовки образцов биоматериала для длительного криохранения |
| Разработчик | Крылов А.В., м.н.с. |
| Рабочее место | ОМГ ЛНП |
| Утверждено | Кононова С.К., гл.н.с., руководитель отдела молекулярной генетики |
| Разработано на основании | 1. Правила лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н);  2. СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».  3. Приказ Минздрава СССР N 770 от 10 июня 1985 г. О введении в действие отраслевого стандарта ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы» |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Визуально | Описание операции | Время выполнения | Используемые материалы и пробы |
| 1 |  | Надеть соответствующую форму одежды. Провести гигиеническую антисептику рук и надеть перчатки, предварительно проверив их на целостность. | 5 мин | Халат лабораторный, хирургический костюм, тапочки лабораторные, антисептик, 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 мин | Пинцет, полуавтоматические пипетки, 70% этиловый спирт, ветошь, пластиковый контейнер для сбора расходных материалов. |
| 3 |  | Взять штатив с вакуумными пробирками с кровью пациентов (от каждого пациента по 2 пробирки). Зафиксировать в журнале проб. | 2 мин | Штатив, вакуумные пробирки с кровью, журнал проб. |
| 4 |  | Каждую пробирку маркируем соответствующим шифром. | 2 мин | Маркер. |
| 5 |  | Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала, поэтому образцы крови с пробиркой для длительного хранения обертываем парафилмом, ставим в штатив и убираем в низкотемпературный морозильник (–86°С) на длительное хранение. | 1 мин | Парафилм, низкотемпературный морозильник. |
| 6 |  | Подготовить пробирки для аликвот. Из зип пакета с помощью  стерильного пинцета вынимаем пробирки эппендорф объемом 1,5 мл и три пробирки объемом 2 мл. Расставляем их в отдельный штатив слева направо, начиная со второго ряда. | 4 мин | Стерильный пинцет, пробирки для аликвот, штатив. |
| 7 |  | Маркируем соответствующим шифром подготовленные микропробирки перманентным маркером с тонким стержнем. Наносим нумерацию на крышке и сбоку пробирки по порядку. | 1 мин | Маркер. |
| 8 |  | Пробирку с кровью пациента необходимо разморозить (в случае если кровь заморожена). | 30 мин |  |
| 9 |  | После разморозки крови, необходимо осторожным переворачиванием перемешать содержимое пробирки. | 15 мин |  |
| 10 |  | Взять дозатор объемом 1000 мкл одеть наконечник с фильтром объемом 1000 мкл. Аккуратно из пробирки набрать 1000 мкл крови и перемесить в пробирку объемом 1,5 мл, на дальнейшее высушивание. | 1 мин | Дозатор v=1000 мкл., наконечник с фильтром 1000 мкл., пробирка объёмом 1,5 мл. |
| 11 |  | В первую пробирку объемом 2 мл с помощью дозатора налить 2 мл крови на дальнейшее хранение. | 1 мин | Дозатор, пробирка с обьемом 2 мл. |
| 12 |  | В две оставшиеся пробирки объемом 2 мл с помощью дозатора налить 1 мл крови для дальнейшей процедуры выделения ДНК. Одна пробирка с ДНК предназначена для длительного хранения, вторая для проведения генетических анализов. | 1 мин | Дозатор, 2х пробирки с обьемом 2 мл. |
| 13 |  | Пробирку с кровью объемом 2 мл, предназначенную для длительного хранения, необходимо обернуть парафилмом. | 1 мин | Парафилм. |
| 14 |  | Подготовленные пробирки с кровью для длительного хранения и для высушивания, помещают в соответствующие промаркированные штативы для микропробирок. | 1 мин | Штатив. |
| 15 |  | Штативы с микропробирками и пробирку с остатками крови помещают в холодильную камеру при температуре не выше минус 70°С. | 1 мин |  |
| 16 |  | Зарегистрировать пробирки в электронной базе данных БРК. | 15 мин |  |
| 17 |  | Из двух оставшихся микропробирок с кровью выделяют ДНК с помощью СОП «Выделение ДНК из замороженной цельной крови фенол- хлороформным методом» либо СОП «Выделение геномной ДНК из цельной крови с помощью набора фирмы Еxcell Вiotech». |  |  |
| 18 |  | Качество выделенной ДНК измеряют с помощью СОП «Контроль качества ДНК с помощью спектрофотометра» затем на ДНК проводят аликвоту с помощью СОП «Приготовление аликвот проб ДНК». |  |  |
| 19 |  | Пробирку с выделенной, проверенной на качество и проаликвоченной ДНК оборачивают парафильмом и помещают в соответствующие промаркированные штативы для микропробирок. Первый штатив для микропробирок предназначен для длительного хранения ДНК, второй штатив для ДНК предназначенной для генетических исследований и третий штатив для аликвот проб ДНК. | 4 мин |  |
| 20 |  | Штативы для микропробирок с образцами ДНК помещают в холодильную камеру при температуре не выше минус 70°С. | 1 мин |  |
| 21 |  | Штатив для микропробирок с аликвотами проб ДНК помещают в холодильную камеру при температуре не выше минус 20°С. | 1 мин |  |
| 22 |  | 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 | 70% этиловый спирт, ветошь, пластиковый контейнер для сбора расходных материалов. |

Суммарная длительность СОП для сохранения 1 образца: 30 мин.

Квалификация сотрудника: младший научный сотрудник.

Оборудование:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Типовая модель | Производитель | Каталожный номер (web – адрес) |
| Крио морозильник | Thermo scientific | Америка | https://www.thermofisher.com/search/results?query=freezer&focusarea=Search%20All&resultPage=3&resultsPerPage=60 |
| Персональный компьютер | H55H-M | Тайвань |  |

Компьютерная программа:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Название (версия) | Web – ссылка на платную версию | Бесплатный аналог (если есть), ссылка |
| Microsoft Windows 7 Professional | https://support.microsoft.com/ru-ru/windows |  |
| Microsoft Exel | https://www.microsoft.com/ru-ru/microsoft-365?ocid=oo\_support\_mix\_marvel\_ups\_support\_smcuhfm365&rtc=1 |  |

Расходные материалы и личные средства защиты:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Много-/одноразовый | Производитель | Каталожный номер (web-адрес) |
| Шариковая ручка | Многоразовый | Любой |  |
| Бумага А4 | Одноразовый | Любой |  |
| Книга учета | Многоразовый | Любой |  |
| Скобы для степлера | Одноразовый | Любой |  |
| Скребки концелярские | Многоразовый | Любой |  |
| Карандаш простой | Многоразовый | Любой |  |
| Маркер | Многоразовый | Любой |  |
| Эппеннорфы (пробирки) | Одноразовый | Любой |  |
| Скотч | Многоразовый | Любой |  |
| Ведро пластиковое | Одноразовый | Любой |  |
| Дозаторы | Одноразовый | Любой |  |
| Перчатки резиновые | Одноразовый | Любой |  |
| Халат лабораторный | Многоразовый | Любой |  |
| Хирургический костюм | Многоразовый | Любой |  |
| Шапочка | Одноразовый | Любой |  |
| Маска | Одноразовый | Любой |  |
| Штатив | Многоразовый | Любой |  |