**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**

**ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**(ИХБФМ СО РАН)**

**Технологический паспорт коллекции**

**«**Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями»

**Новосибирск - 2017**

**Общая информация:**

* Название коллекции - **«Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями»**
* Держатель коллекции - **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)**
* **Цели и задачи** - Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями создана, поддерживается и пополняется с целью исследования молекулярных механизмов развития мультифакторных заболеваний, а также исследования молекулярных механизмов развития заболеваний. Коллекции, задепонированные в ЦКП, могут быть предоставлены для выполнения мультицентровых исследований в рамках консорциума.

**Объем коллекции** – более 10 000 образцовДНК, РНК и плазмы, полученные от пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями:

* рассеянный склероз;
* болезнь Паркинсона;
* сахарный диабет 2 типа;
* рак молочной железы (семейная и спорадическая формы);
* рак яичников;
* метаболический синдром;
* варикозная болезнь вен нижних конечностей;
* рак простаты.

Все образцы детально клинически охарактеризованы, сведения хранятся в базах данных. Информацию об актуальном составе коллекции можно получить по запросу в виде вывода из электронной базы данных.

**АДРЕС:**

630090, Россия, г. Новосибирск,

Пр-т Академика Лаврентьева, 8

http://www.niboch.nsc.ru

**РУКОВОДИТЕЛЬ:**

Филипенко Максим Леонидович, к.б.н.

**КОНТАКТНОЕ ЛИЦО:**

Соколова Екатерина Алексеевна

тел. (383) 363-51-71

e-mail: sokolovaea2608@gmail.com

* Перечень ключевых СОП:
* **СОП «Идентификация и характеризация биоматериала пациентов»;**
* **СОП «Выделение ДНК из биоматериала пациентов»;**
* **СОП «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов»;**
* **СОП «Контроль качества образцов биоматериала»;**
* **СОП «Выделение РНК из биоматериала пациентов»**
* **СОП «Выделение циркулирующей ДНК из плазмы».**

Полная версия всех СОПов <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/md_collection>

* Инфраструктура:
* **Процедурный кабинет**
* **Молекулярно-биологическая лаборатория**
* **Моечная**
* **Ламинарный бокс**
* **Комната для хранения**

1. **Полная информация:**

**СОП-ЛФ-1.ИиХБП-001**

**Идентификация и характеризация биоматериала пациентов**

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок идентификации и характеризации биоматериалов пациентов, депонированных в КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

1. **Назначение**

Проверка качества образца биоматериала пациента, подлежащего депонированию в КБМЗ ИХБФМ СО РАН, и сопроводительной информации к нему является первым этапом включения образца в Коллекцию биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**КБМЗ** – Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями

**Оператор** – сотрудник лаборатории, в должностные обязанности которого входит проведение и обеспечение работ по забору и хранению биоматериала пациентов.

1. **Пересмотр**

Данная СОП вводится впервые.

1. **Материалы и оборудование**
   1. ***Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| Емкость для дезинфицирующего раствора | VITLAB, Германия |
| Мерные цилиндры вместимость 50 мл, 1000 мл, 4 штуки | ГОСТ 1770-74 |
| Перекись водорода, медицинская | ГОСТ 177-88 |
| Штатив на 15 мл, 40 мест, полипропилен, d 20 мм, 100 штук | Deltalab, Испания |
| Штатив для пробирок 1,5-2 мл, на 80 мест | Axygen, США |
| Клейкая лента канцелярская Attache прозрачная 19 мм х 33 м (пластиковая втулка) | Attache, Россия |
| Маркер перманентный Paper Mate SHARPIE TWIN TIP, 1 мм | Paper Mate, США |

* 1. ***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Термоконтейнер медицинский | Термо-Конт МК, Россия |
| Шкаф лабораторный вытяжной с блоком УФ-облучения | ЗАО "ЛАМИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ", Россия |
| Сканер штрих-кода | QuickScan QD2430, USA |
| Холодильник (+40С) для хранения биоматериала (кровь), 2 штуки | Indesit, Италия |
| Морозильник низкотемпературный (-800C)для хранения биоматериала (плазма), 2 шт. | Thermo Scientific, США |
| Дистиллятор | SG-Wasser, Сингапур |

* 1. ***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется на базе лаборатории фармакогеномики ИХБФМ.

1. **Процедура**
   1. ***Подготовительный этап***

***7.1.1. Подготовка персонала к проведению работ***

– надеть халат медицинский, перчатки, колпак и маску. Дальнейшую работу вести в условиях ламинарного вытяжного шкафа с блоком УФ-облучения.

***7.1.2. Приготовление дезинфицирующего раствора***

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

***7.1.3. Подготовка боксового помещения к работе***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать вытяжной шкаф и помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

***7.2. Основной этап***

***7.2.1. Проверка выполнения условий доставки биоматериала***

Образцы биоматериала доставляются в лабораторию курьерской почтовой службой в транспортном термоконтейнере с набором хладагентов и емкостью для размещения комплекта биологического материала в установленные сроки.

При получении термоконтейнера сотрудником лаборатории проводится визуальный контроль целостности термоконтейнера; проверяется наличие сопроводительной документации. После открытия термоконтейнера проверяется наличие аккумуляторов холода их целостность и агрегатное состояние – внутри хладагентов должен быть лед, если доставка осуществлялась на сухом льду, в термоконтейнере должен быть сухой лед.

Емкость с биоматериалом пациента (пробирка, термос) должна быть неповрежденной и герметичной. После осуществления процедуры проверки условий доставки образцы биоматериала размещают в лабораторном вытяжном шкафу с УФ-облучением для проверки качества полученного биологического материала и проверки полноты сведений о нем в сопроводительной документации.

***7.2.2. Идентификация и характеризация полученного биоматериала***

Образцы биоматериала пациента, подлежащего депонированию в КБМЗ ИХБФМ СО РАН, должны быть заморожены, пронумерованы согласно сопроводительной документации.

После осуществления процедуры контроля качества полученного биологического материала, проверки полноты сведений, представленных в сопроводительной документации, и заполнения на него учетной документации биологический материал получает шифр и размещается в основном хранилище в КБМЗ ИХБФМ СО РАН. Если образцы были деперсонифицированы в месте сбора материала, оператор обязан ввести в базу данных код образцов, отправителя, всю сопроводительную информацию. Если образцы содержат персональную информацию, оператор обязан проверить наличие в сопроводительной документации информированного соглашения от пациента на участие в исследовании, затем ввести в базу данных данные пациента: ФИО, дату рождения, адрес проживания и другие данные: номер учреждения, отделение, ФИО врача, назначившего исследования, диагноз.

В случае наличия штрих–кода с помощью декодера осуществляется автоматическое внесение образца в базу данных КБМЗ ИХБФМ СО РАН. В случае отсутствия штрих-кода оператор обязан самостоятельно вносить номер образца в учетную документацию. В приложении (п. 10.2.) рассмотрены другие виды несоответствия и их устранение.

В случае неполного предоставления данных о больном, от которого был получен образец крови, в соответствующую региональную лабораторию направляется запрос на недостающие сведения. Предоставление необходимых сведений возможно только путем дополнительного опроса пациента с внесением данных в историю болезни пациента.

***7.3. Завершающий этап***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать вытяжной шкаф и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин

– перед использованием штатива, его необходимо замочить в 6% растворе перекиси водорода, избегая образования воздушных пробок. Экспозиция не менее 6 ч.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.
7. **Нормативные ссылки.**
   * + 1. Методические рекомендации «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований крови» (Одобрены на общероссийской научно-практической конференции «Реальные клинико-диагностические лабораторные услуги: степень соответствия стандартам лабораторной медицины, качество, себестоимость и цена» (Москва, 2-4 октября 2012 г.)
       2. ГОСТ Р 53079.4─2008. «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». Введен в действие с 1.01.2010 года.
       3. СанПин 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных заболеваний»
       4. «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
       5. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», 2009 г.
8. **Приложение**

**10.1. Внешний вид термоконтейнера для пересылки образцов биологического материала**



**10.2. Виды несоответствия и их устранение**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вид несоответствия | Описание действий | Исполнитель | Ответственный |
| Нарушение целостности  контейнера | Сообщить об этом  старшему лаборанту лаборатории | Оператор | Старший лаборант |
| Отсутствие сопроводительной документации | Оператор  сообщает об этом старшему лаборанту лаборатории, который должен связаться по телефону со старшей мед. сестрой данного  учреждения | Оператор | Cтарший лаборант |
| Проливание биологического материала в контейнере | 1. Сообщить об этом старшему лаборанту лаборатории  2. Аккуратно удалить все содержимое из контейнера  3. Провести дезинфекцию самого контейнера и всего содержимого контейнера, что соприкасалось с пролитым биоматериалом. | Оператор | Cтарший лаборант |
| Испорченная сопроводительная документация (порвался, пролилось содержимое  контейнера и т.д.) | 1. Оператор в случае читабельности сопроводительной документации, переносит всю информацию на новый бланк.  2. В случае нечитабельности, оператор сообщает старшему лаборанту, который связывается с старшей мед. сестрой учреждения . | Оператор | Cтарший лаборант |
| Отсутствие штрих-кода  на пробирке (если есть предварительная договоренность о штрих - кодировании) | 1.Оператор сообщает об этом старшему лаборанту лаборатории, который должен связаться по телефону со старшей мед. Сестрой данного учреждения и доложить о данном несоответствии.  2. Данное несоответствие оператор вносит в журнал «Регистрации брака» | Оператор | Cтарший лаборант |

**СОП-ЛФ-2.ВДНК-001**

**Выделение ДНК из биоматериала пациентов**

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок выделения ДНК из биологического материала (венозной крови) пациента.

1. **Назначение**

Выделение ДНК из биоматериала значительно снижает ее деградацию во время хранения образца биоматериала пациента.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**КБМЗ** - Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями

**фенол-TE** – раствор фенола, уравновешенный ТЕ

1. **Пересмотр**

Данная СОП вводится впервые.

1. **Материалы и оборудование**
   1. **Материалы и реактивы**

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| Автоматическая пипетка вместимостью 5÷40 мкл | «Ленпипет», Россия |
| Автоматическая пипетка вместимостью 20÷200 мкл | «Ленпипет», Россия |
| Автоматическая пипетка вместимостью 100÷1000 мкл | «Ленпипет», Россия |
| [Штатив-подставка для пипеток универсальный на 5 дозаторов](http://www.helicon.ru/catalog/detail.php?IBLOCK_ID=4&SECTION_ID=326&ELEMENT_ID=2223) | «Ленпипет», Россия |
| Пробирки 15 мл, ПП, резьбовые, конические, с крышкой | Axygen, США |
| Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл | Axygen, США |
| Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без фильтра фильтром до 200 и до 1000 мкл | Axygen, США |
| Штатив на 15 мл, 40 мест, полипропилен, d 20 мм | Хеликон, Россия |
| Емкость для дезинфицирующего раствора | VITLAB, Германия |
| Мерный цилиндр объемом 100 мл, 500 мл и 1000 мл | VITLAB, Германия |
| Емкость для хранения растворов и буферов | SIMAX, Чехия |
| Перекись водорода | ООО «Росбио», РФ |
| Натрий додецилсульфат (SDS) 85,0 %, Pharm grade | Panreac, США |
| Фенол ультрачистый для молекулярной биологии более 99,7 %, осч | ГОСТ 23519-93 |
| Трихлорметан (стабилизированный 0,6-1,0% масс. этанола) (ЧДА) | ГОСТ 20015-88 |
| Протеиназа К | СибЭнзим, Россия |
| Трисгидроксиметиламинометан (Tris-base) | Sigma, США |
| ЭДТА | Sigma, США |
| Ацетат натрия трехводный | ГОСТ 199-78 |
| Рибонуклеаза А | SERVA, США |
| Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья | ГОСТ 31810-2012 |
| Пакеты полипропиленовые одноразовые с индикаторами стерилизации, для сбора и термической обработки (дезинфекции и утилизации) медико-биологических отходов | АБРИС+, РФ |
| Мерный стакан, вместимостью 1000 мл | ГОСТ 1770-74 |
| Палочки из боросиликатного стекла | ГОСТ 27460-87 |
| Соляная кислота 37,0 %, Ph | ГОСТ 3118-77 |
| Глицерин дистиллированный | ГОСТ 6824-96 |
| Ледяная уксусная кислота | ГОСТ 61-75 |
| Магний хлористый 6-водный | ГОСТ 4209-77 |
| Хлористый натрий | ГОСТ 4233-77 |
| Натрия гидроокись | ГОСТ 4328-77 |
| 8-гидроксихинин | Sigma, США |
| Клейкая лента канцелярская Attache прозрачная 19 мм х 33 м (пластиковая втулка) | Attache, Россия |
| Маркер перманентный Paper Mate SHARPIE TWIN TIP, 1 мм | Paper Mate, США |

* 1. **Оборудование**

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Холодильник -20С | KRAFT, Россия |
| Бокс биологической безопасности II класса защиты | ЗАО "Ламинарные системы", РФ |
| Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл до 14000 об/мин | Eppendorf, ФРГ |
| Термостатируемый шейкер для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл | Biosan, Латвия |
| Термостат ТС-80-М2 | НПО Техноком, Россия |
| Центрифуга Eppendorf 5810R | Eppendorf, Германия |
| Ультрафиолетовый облучатель | ARMED, Россия |
| Автоклавная установка | ЗАО «Тюменьский завод медицинского оборудования и инструментов», РФ |
| Дистиллятор | SG-Wasser, Сингапур |
| Вортекс | Advanced Vortex Mixer Talboys, Troemner, США |
| Прецизионные лабораторные весы KERN 572 | Kern & Sohn, Германия |
| pH-метр, 765 Laboratory pH Meter | Knick, Германия |

* 1. **Комплект спецодежды**

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется в помещениях лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

1. **Процедура**
   1. **Подготовительный этап**

**7.1.1. Подготовка персонала к проведению работ**

– надеть сменную обувь, медицинский халат и перчатки и шапочку.

**7.1.2. Подготовка боксового помещения к работе**

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

**7.1.3. Приготовление 1M раствора Tris-HCl**

**-** взвесьте (121,1±0,1) г Tris-base, внесите в мерный стакан, добавьте 800 мл дистиллированной воды. Титруйте раствор соляной кислотой с помощью pH-метра до достижения pH=8.0. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной водой.

**7.1.4. Приготовление 1M раствора СaCl2**

– взвесьте (11,1±0,1) г СaCl2, внесите в мерный цилиндр, доведите дистиллированной водой до 100 мл.

**7.1.5. Приготовление буфера для протеиназы К**

– в пробирку 15 мл внесите пипеткой 100 мкл 1M раствора Tris-HCl и 10 мкл 1М раствора СaCl2, доведите до 7 мл дистиллированной водой, добавьте 3 мл глицерина.

**7.1.6. Приготовление раствора протеиназы К (20мг/мл)**

– взвесить (2,0±0,1) г протеиназы К, внесите в мерный цилиндр, доведите буфером для протеиназы К до 10 мл.

**7.1.7. Приготовление 10% раствора SDS**

– взвесить (10,0±0,1) г додецилсульфата натрия, внести в мерный цилиндр, довести дистиллированной водой до 100 мл. Для лучшего растворения поместите смесь в термостат на 65 ºС.

**7.1.8. Приготовление растовра РНК-азы**

- взвесьте (0,2±0,1) г рибонуклеазы А, перенесите в пробирку на 15 мл, добавьте 10 мкл 1М раствора Tris-HCl, доведите до 10 мл водой

**7.1.9. Приготовление раствора 3М ацетата натрия**

- взвесьте (408,0±0,1) г ацетата натрия трехводного, перенесите в мерный цилиндр, добавьте 800 мл дистиллированной воды. Титруйте раствор уксусной кислотой с помощью pH-метра до достижения pH=5.0-5.2. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной водой.

**7.1.10. Приготовление 75% раствора этанола**

– налейте в стеклянный цилиндр (78±1) мл 96% этилового спирта и доведите объем до 100 мл дистиллированной водой;

**7.1.11. Приготовление 1M раствора MgCl2**

– взвесьте (203,0±0,1) г магния хлористого 6-водного, внесите в мерный цилиндр, доведите дистиллированной водой до 1000 мл.

**7.1.12. Приготовление 5M раствора NaCl**

– взвесьте (292,5±0,1) г натрия хлористого, внесите в мерный цилиндр, доведите дистиллированной водой до 1000 мл.

**7.1.13. Приготовление лизирующего буфера**

– налейте в емкость (банку с крышкой) для хранения с помощью пипетки вместимостью 100÷1000 мкл 4 мл 1М раствора Tris-HCl, 2 мл 1M раствора MgCl2, 800 мкл 5M раствора NaCl. Доведите дистиллированной водой объем до 400 мл.

**7.1.14. Приготовление 0.5 М раствора ЭДТА**

- взвесьте (292,2±0,1) г ЭДТА, перенесите в мерный цилиндр, добавьте 800 мл дистиллированной воды. Титруйте раствор гидроксидом натрия с помощью pH-метра до достижения pH=8.0. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной водой.

**7.1.15. Приготовление буфера для проназы**

– налейте в емкость (банку с крышкой) для хранения с помощью мерного цилиндра 40 мл 1М раствора Tris-HCl, 2 мл 1M раствора MgCl2, 8 мл 5M раствора NaCl, 4 мл 1М раствора ЭДТА. Доведите дистиллированной водой объем до 400 мл.

**7.1.16. Приготовление раствора ТЕ**

– налейте в емкость (банку с крышкой) для хранения с помощью пипетки вместимостью 100÷1000 мкл 4 мл 1М раствора Tris-HCl, 400мкл 0,5М раствора ЭДТА. Доведите дистиллированной водой объем до 400 мл.

**7.1.17. Приготовление раствора фенола, уравношенного ТЕ**

П.1. работу с фенолом ведите в вытяжном шкафу;

П.2. разморозьте фенол. Поставьте торговую упаковку фенола в стакан большего диаметра с водой, стакан поставьте в термостат на +37 ºС. Дождитесь пока фенол разморозится;

П.3. перелейте фенол в мерный стакан вместимостью 2000 мл;

П.4 добавьте 200 мл ТЕ, перемешайте стеклянной палочкой, дождитесь расслоения фаз, замерьте pH, если pH не достиг значения 8.0, отберите верхнюю фазу;

П.5. повторяйте пункт 4 до тех пор, пока pHверхней фазы не достигнет значения 8.0. Обычно на это требуется пять повторений пункта 4;

П.6. Добавьте 200 мг 8 гидроксихинина к полученому раствору фенола и ТЕ.

П.7. Перенесите раствор в стеклянную емкость с плотно завинчивающейся крышкой. Храните раствор при +4С.

**7.2. Основной этап**

П.1. Весь образец крови объемом 3-5 мл поместите в пробирку на 15 мл. Если возможно, то удалите предварительно прозрачную плазму.

П.2. Добавьте до риски 15 мл лизирующий буфер, плотно закройте крышку. Тщательно перемешайте, переворачивая пробирку несколько раз. Оставьте пробирку на столе на 10 минут.

П.3. Центрифугируйте пробирку при 1000 g 10 минут. Достаньте пробирку из центрифуги, удалите надосадочную жидкость (если осадка не видно, то допустимо оставить 2 мл).

П.4. Еще раз добавьте до риски 15 мл лизирующий буфер, плотно закройте крышку. Тщательно перемешайте, переворачивая пробирку несколько раз. Оставьте пробирку на столе на 10 минут.

П.5. Центрифугируйте пробирку при 1000 g 10 минут. Достаньте пробирку из центрифуги, удалите надосадочную жидкость максимально, но сохраняя осадок.

П.6. Осадок ресуспендируйте на вортексе в 700-750 мкл буфера для проназы, добавьте 100 мкл 10% SDS и 50 мкл раствора протеиназы К.

П.7. Перенесите по 500 мкл смеси из п.6. в 2 пробирки по 1,5 мл.

П.8. Поместите пробирки в термостат (65ºС) и оставить на 10-12 часов.

П.9. Достаньте пробирки из термостата и разместите в штативе в боксе. Добавьте в каждую пробирку по 8 мкл раствора РНКазы, перемешайте на вортексе, выдержите 10-20 мин на столе.

П10. Добавьте в каждую пробирку 200 мкл фенола, уравновешенного ТЕ и 200 мкл хлороформа. Тщательно перемешайте на вортексе.

ВНИМАНИЕ: фенол-TE – нижняя желтая фаза двухфазной смеси.

П.11. Центрифугируйте образец 10 мин при 8 000 g.

П.12. Отберите 400 мкл водной (верхней) фазы в три приема по 200 мкл носиком на 200 мкл в новую 1.5 мл пробирку. Старайтесь отбирать водную фазу медленно, иначе вы захватите интерфазу.

П.13. Добавьте в каждую пробирку 1000 мкл этанола, перемешайте, и добавьте в каждую пробирку 50 мкл раствора 3М ацетата натрия.

П.14. Поместите образцы в холодильник на -20 ºС на 30 минут.

П.15. Центрифугируйте 15 мин при 15 000 g.

П.16. Удалите надосадочную жидкость. Добавьте в каждую пробирку 180 мкл 75% раствора этанола. Центрифугируйте 1 мин при 15 000 g.

П.17. Удалите надосадочную жидкость. Поместите пробирки в термостат на +37 ºС до полного высыхания. Запаха этанола быть не должно.

П.18. После полного высыхания добавьте в каждую пробирку 200 мкл раствора 10 mM Tris (pH=7.8).

П.19. Поместить образцы в термостатируемый шейкер на 65ºС на 15 минут. Затем образцы размесить на храниние в холодильник на -20 ºС.

**7.3 Завершающий этап**

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин.

– невостребованные биологические образцы подвергаются списанию, инактивации и уничтожению.

- инактивацию и уничтожение биообразцов и контейнеров проводят автоклавированием в пакетах для дезинфекции и утилизации медико-биологических отходов. После автоклавирования пакеты выбрасывают как бытовые отходы.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней
7. **Нормативные ссылки.**
   * + 1. Методические рекомендации «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований крови» (Одобрены на общероссийской научно-практической конференции «Реальные клинико-диагностические лабораторные услуги: степень соответствия стандартам лабораторной медицины, качество, себестоимость и цена» (Москва, 2-4 октября 2012 г.)
       2. ГОСТ Р 53079.4─2008. «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». Введен в действие с 1.01.2010 года.
       3. СанПин 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных заболеваний»
       4. «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
       5. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», 2009 г.

**СОП-ЛФ-3.ХБП-001**

**Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов**

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок хранения биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов, депонированных в КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

1. **Назначение**

Хранение – содержание биоматериала (ДНК, РНК, плазма) при контролируемых условиях, целесообразных требованиям, предъявляемым к биоматериалу, перед его исследованием или иной формой обращения.

1. **Термины и определения**

СОП **–** стандартная операционная процедура;

1. **Пересмотр**

Данная СОП вводится впервые.

1. **Материалы и оборудование**
   1. **Материалы и реактивы**

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| Емкость для дезинфицирующего раствора | VITLAB, Германия |
| Мерный цилиндр объемом 100 мл и 1000 мл | VITLAB, Германия |
| Перекись водорода | ООО «Росбио», РФ |
| Автоматическая пипетка вместимостью 20÷200 мкл | «Ленпипет», Россия |
| Автоматическая пипетка вместимостью 100÷1000 мкл | «Ленпипет», Россия |
| [Штатив-подставка для пипеток универсальный на 5 дозаторов](http://www.helicon.ru/catalog/detail.php?IBLOCK_ID=4&SECTION_ID=326&ELEMENT_ID=2223) | «Ленпипет», Россия |
| Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл, свободны от РНК-аз | Axygen, США |
| Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл или 2,0 мл | Axygen, США |
| Штатив на 15 мл, 40 мест, полипропилен, d 20 мм, 100 штук | Deltalab, Испания |
| Штатив для пробирок 1,5-2 мл, на 80 мест | Axygen, США |
| Клейкая лента канцелярская Attache прозрачная 19 мм х 33 м (пластиковая втулка) | Attache, Россия |
| Маркер перманентный Paper Mate SHARPIE TWIN TIP, 1 мм | Paper Mate, США |
| Тетрадь для регистрации работы холодильника | Attache, Россия |

* 1. **Оборудование**

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Холодильник +4С | Indesit, Италия |
| Кельвинатор -20С | Thermo Scientific, США |
| Кельвинатор -80С | Thermo Scientific, США |
| Бокс биологической безопасности II класса защиты | ЗАО "Ламинарные системы", РФ |
| Центрифуга для пробирок объемом до 15 мл, 100–3500 об/мин | ELMI, Латвия |
| Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл до 14000 об/мин | Eppendorf, ФРГ |
| Термостатируемый шейкер для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл | Biosan, Латвия |
| Льдогенератор | Koreco, ЮКорея |
| Облучатель-рециркулятор медицинский "Armed" СН511-115 (пластиковый корпус) | ARMED, Россия |
| Стерилизатор паровой вк-75-01 | ЗАО «Тюменьский завод медицинского оборудования и инструментов», РФ |
| Дистиллятор | SG-Wasser, Сингапур |
| Источник бесперебойного питания | APC, США |
| Компьютер с принтером | ASUS, Китайская Республика |

* 1. **Комплект спецодежды**

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется в помещениях лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

1. **Процедура**
   1. **Подготовительный этап**

**7.1.1. Поступление образцов**

– образцы биоматериала поступают в КБМЗ в сопровождении следующей информации: источник происхождения образцов, описание образцов, способ выделения/обработки, дата сбора и выделения/обработки, общее количество, контактное лицо.

– при поступлении образцов фиксируется сопровождающая информация, состояние образцов на момент поступления (заморожены/разморожены), дата поступления.

**7.1.2. Подготовка персонала к проведению работ**

– надеть сменную обувь, медицинский халат и перчатки.

**7.1.3. Подготовка боксового помещения к работе**

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

– подготовить емкость со льдом.

**7.2. Основной этап**

**7.2.1. Размещение биообразцов для хранения**

– при транспортировке и первичной обработке при поступлении запрещается размораживание биообразцов. В случае если существует риск размораживания образцов при транспортировке, и немедленная дальнейшая обработка не предполагается, следует неотложно заморозить образцы.

– распаковать транспортную упаковку, оценить состояние образцов (заморожены/разморожены), целостность пробирок, убедиться в наличие информативной маркировки образцов или нанести.

– все манипуляции с образцами проводят на льду, не допуская размораживания.

– сопровождающая биообразцы информация вносится в базу данных КБМЗ, указывается место хранения образцов.

**7.2.1.1 Размещение ДНК для хранения**

– образцы ДНК вне зависимости от способа выделения и способа стабилизации хранят при температуре –20С – –60С, если иное не указано в инструкции разработчика стабилизирующего раствора.

– образцы ДНК могут быть аликвотированы.

– допускается хранение образцов ДНК в маркированных пакетах, планшетах, коробках. Допускается переворачивание пробирок с образцами во время хранения.

**7.2.1.1.1 Аликвотирование ДНК**

- подпишите пробирки на 1,5 мл, разместите пробирки в штатив.

- разморозьте образцы с ДНК на столе, незамедлительно переносите растаявшие образцы на лед, пока все образцы не окажутся на льду.

- перенесите аликвоту образца в пробирки с помощью автоматической пипетки и наконечника с фильтром. Держите образцы на льду, пока не разаликвотите все образцы.

- внесите в сопровождающую образцы информаци следующие данные: дата разаликвочивания, ФИО исполнителя, объем перенесенного образца и количество аликовт, цель разаликвочивания, место хранения аликвот.

**7.2.1.2 Размещение РНК для хранения**

– образцы РНК вне зависимости от способа выделения и способа стабилизации хранят при температуре ниже –60С, если иное не указано в инструкции разработчика стабилизирующего раствора.

– не допускается аликвотрирование образцов РНК. Аликвотирование выполняют одновременно с исследованием.

– допускается хранение образцов РНК в маркированных планшетах. Не допускается переворачивание пробирок с образцами во время хранения.

**7.2.1.3 Размещение плазмы для хранения**

– образцы плазмы вне зависимости от способа приготовления и способа стабилизации хранят при температуре ниже –60С, если иное не указано в инструкции разработчика стабилизирующего раствора.

– не допускается аликвотрирование образцов плазмы. Аликвотирование выполняют одновременно с исследованием.

– допускается хранение образцов плазмы в маркированных планшетах. Не допускается переворачивание пробирок с образцами во время хранения.

**7.2.1.4 Размещение крови для хранения**

– образцы крови хранят при +4С не более двух суток, если предполагается дальнейшая обработка, или замораживают и хранят при –20С.

– образцы крови могут быть аликвотированы. Для этого часть объема образца переносят в новую маркированную пробирку типа Eppendorf.

– допускается хранение образцов крови в маркированных планшетах. Не допускается переворачивание пробирок с образцами во время хранения.

**7.2.1.5 Рразмещение иного биоматериала для хранения**

– иной биоматериал (ткани, моча, слюна, кал и др) хранят исходя из целесообразности: в целях последующего выделения ДНК/РНК замораживают при –20С – –60С.

**7.2.2. Хранение биообразцов**

– срок хранения биообразцов при соблюдении температурного режима не ограничивается.

– допускается хранение биообразцов различной природы в одном холодильнике. Не допускается перемешивание биообразцов из разных коллекций и их совместное хранение в пакетах, планшетах, коробках.

– за работой холодильного оборудования осуществляется систематический визуальный контроль. Регистрируются в журнале все изменения температуры холодильного оборудования более чем на 1С.

– при аварийном отключении электроэнергии и размораживании холодильной камеры составляют акт о нарушении хранения образцов биологического материала. Биологические образцы с утраченными аттестационными характеристиками подвергаются списанию, инактивации и уничтожению.

– все холодильное оборудование должно быть подключено к системе бесперебойного питания, обеспечивающей автономную работу оборудования не менее 3х часов.

**7.2.4 Завершающий этап**

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин.

– невостребованные биологические образцы подвергаются списанию, инактивации и уничтожению.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.

**СОП-ЛФ-4.ККБ-001**

**Контроль качества образцов биоматериала**

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок контроля качества образцов биоматериала пациентов (ДНК, РНК и плазма), депонированных в КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

1. **Назначение**

Проверка качества образца КБМЗ ИХБФМ СО РАН является основным этапом поддержания Коллекции биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями в рабочем состоянии. Проверка качества образца производится в момент депонирования в КБМЗ ИХБФМ СО РАН и перед включением образца в исследование.

Настоящая СОП предназначена для сотрудников лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**КБМЗ** - Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями;

**ПЦР –** полимеразная цепная реакция;

**Оператор** – сотрудник лаборатории, в должностные обязанности которого входит проведение и обеспечение работ по выделению нуклеиновых кислот из плазмы.

1. **Пересмотр**

Данная СОП вводится впервые.

1. **Материалы и оборудование**
   1. ***Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| Колба 250 мл из термостойкого стекла | ГОСТ 1770-74, Россия |
| Ультрамикронаконечники 0,5-10 мкл, универсальные, Maxymum Recovery | Axygen Scientific Inc., США |
| Наконечники до 1000 мкл (от 100 мкл), голубые, 100 шт./штатив | Axygen Scientific Inc., США |
| Пробирки типа Eppendorf 1.5 мл | Axygen Scientific Inc., США |
| Мерные цилиндры вместимость 50 мл, 500 мл, 1000 мл, 2000 мл | ГОСТ 1770-74 |
| Штатив для пробирок 1,5-2 мл, на 80 мест | Хеликон, Россия |
| Штатив-подставка для пипеток универсальный на 5 дозаторов | Хеликон, Россия |
| Пипетки вместимостью 1÷10 мкл | «Ленпипет», Россия |
| Пипетки вместимостью 100÷1000 мкл | «Ленпипет», Россия |
| Хирургический скальпель | Тумботино, Россия |
| Клейкая лента канцелярская Attache прозрачная 19 мм х 33 м (пластиковая втулка) | Attache, Россия |
| Маркер перманентный Paper Mate SHARPIE TWIN TIP, 1 мм | Paper Mate, США |
| Бумага фильтровальная лабораторная | ГОСТ 12026-76 |
| Пакеты полипропиленовые одноразовые с индикаторами стерилизации, для сбора и термической обработки (дезинфекции и утилизации) медико-биологических отходов | АБРИС+, РФ |
| Дистиллированная вода качества MQ-вода | ГОСТ 6709-72 |
| Агароза для электофореза | Sigma, США |
| Трисгидроксиметиламинометан (Tris-base) | Sigma, США |
| ЭДТА | Sigma, США |
| Ацетат натрия, осч | Sigma, США |
| Концентрированная (ледяная) уксусная кислота | ГОСТ 61-75 |
| Маркер длин 1 т.п.н. | Биосан, Россия |
| Бромистый этидий | Sigma, США |

* 1. ***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Спектрофотометр | NanoDrop™ Lite Spectrophotometer , Thermo Scientific™, США |
| Термостат Thermo-Shaker TS-100C | BioSan, Латвия |
| Прецизионные лабораторные весы KERN 572 | Kern & Sohn, Германия |
| Камера для горизонтального электрофореза SE-2 | Хеликон, Россия |
| Источник питания, 5-400 В, 5-400 мА, 0,5-80 Вт, 2 выхода, Эльф-4 | ДНК-Технология, Россия |
| Электроприбор лабораторный немедицинского назначения: гель-документирующее устройство, модель: GelDoc XR | BioRad, США |
| Персональный компьютер с программным обеспечением для гель-документирующего устройства модели: GelDoc XR | ASUS, Тайвань |
| Спектрофотометр | Ultrospec 500 pro Visible spectrophotometer, Amersham Biosciences, Великобритания |
| Автоклавная установка | ЗАО «Тюменьский завод медицинского оборудования и инструментов», РФ |

* 1. ***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется в помещениях лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

1. **Процедура**
   1. ***Подготовительный этап***

***7.1.1. Подготовка персонала к проведению работ***

– надеть медицинский халат и перчатки, колпак и маску перед началом работ.

***7.1.2. Приготовление концентрированного буфера ТАЕ (20×)***

– взвесить 108,8 г ацетата натрия трехводного, 193,6 г Tris-base, 14,88 г ЭДТА;

- растворить в 1,5 л в MQ-воде, довести pH до 8.0 ледяной уксусной кислотой и довести объем раствора в мерном цилинде до 2 л.

***7.1.3. Приготовление рабочего буфера ТАЕ***

– влить в мерный цилиндр 50 мл концентрированного ТАЕ и довести MQ-водой до 1000 мл, закрыть фольгой, перемешать, проавтоклавировать 40 минут.

***7.1.3. Приготовление 1%-ного агарозного геля для ДНК***

– взвесить (1±0,1) г агарозы и пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла;

– добавить 100 мл рабочего электрофорезного буфера, перемешать и расплавить в СВЧ-печи до полного растворения агарозы;

– остудить до температуры 65 – 70 °С;

– добавить 5 мкл раствора бромистого этидия 10 мкг/мл;

– поместить плашку для заливки геля на заливочный столик, установленный горизонтально. Выровнять столик для заливки геля. Вставить гребенку в плашку, закрепить гребенку и залить расплавленный охлажденный до температуры 65 – 70 ºС гель в плашку толщиной 0,6 см. Если образовались пузыри, их необходимо удалить;

– вынуть гребенку из геля после полного застывания, не повредив карманы;

– аккуратно вырезать гель из плашки с помощью скальпеля;

– поместить гель в камеру для горизонтального электрофореза;

– залить в камеру рабочий раствор буфера в таком количестве, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху;

– промыть карманы пипетированием, не касаясь дна, аккуратно. Убедиться в отсутствии пузырьков воздуха в них.

***7.1.4. Приготовление 1,5%-ного агарозного геля для РНК***

– взвесить (1,5±0,1) г агарозы и пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла;

– добавить 100 мл рабочего электрофорезного буфера, перемешать и расплавить в СВЧ-печи до полного растворения агарозы;

– остудить до температуры 65 – 70 °С;

– добавить 5 мкл раствора бромистого этидия 10 мкг/мл;

– поместить плашку для заливки геля на заливочный столик, установленный горизонтально. Выровнять столик для заливки геля. Вставить гребенку в плашку, закрепить гребенку и залить расплавленный охлажденный до температуры 65 – 70 ºС гель в плашку толщиной 0,6 см. Если образовались пузыри, их необходимо удалить;

– вынуть гребенку из геля после полного застывания, не повредив карманы;

– аккуратно вырезать гель из плашки с помощью скальпеля;

– поместить гель в камеру для горизонтального электрофореза;

– залить в камеру рабочий раствор буфера в таком количестве, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху;

– промыть карманы пипетированием, не касаясь дна, аккуратно. Убедиться в отсутствии пузырьков воздуха в них.

***7.1.5. Приготовление дезинфицирующего раствора***

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч.

***7.2. Основной этап***

***7.2.1. Подготовка персонала к проведению работ***

– надеть боксовый халат, перчатки, шапочку и медицинскую маску.

***7.2.2. Оценка сохранности кодировки образца биоматериала***

– визуально оценить сохранность надписи с кодом образца биоматериала на пробирке. В случае деформации надписи или закрывающего ее скотча оператор обязан перенести образец в новую пробирку, указать на ней код образца маркером, заклеить надпись клейкой лентой. Если надпись нечитаемая, то оператор обязан утилизовать образец.

***7.2.3. Оценка количества биоматериала (ДНК, РНК) в образце***

***7.2.3.1 Оценка количества ДНК в образце спектрофотометрическим методом***

– образец ДНК предварительно разморозить в термостате;

– включить прибор NanoDrop™ Lite Spectrophotometer;

– выбрать программу «dsDNA»;

– провести считывание «фона»: а) промыть датчик прибора нанесением 3 мкл дистиллированной воды, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой, б) нанести 2 мкл дистиллированной воды на датчик прибора, провести измерение Blank, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой, в) еще раз нанести 2 мкл дистиллированной воды на датчик прибора, провести второе измерение Blank, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой, г) если считывание «фона» прошло успешно, то прибор выведет на дисплей сообщение «Blank confirmed», д) если считывание «фона» не выполнено, то повторить пункты а)-в) еще раз.

– нанести на датчик 2 мкл образца ДНК, провести измерение, зафиксировать письменно величины: коэффициент A260/280, концентрацию ДНК в нг/мкл;

– промыть датчик нанесением 2 мкл дистиллированной воды, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой;

– повторить измерение. Нанести на датчик 2 мкл образца ДНК, провести измерение, зафиксировать письменно величины: коэффициент A260/280, концентрацию ДНК в нг/мкл;

– промыть датчик нанесением 2 мкл дистиллированной воды, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой;

– выключить прибор;

– после оценки количества ДНК в образце спектрофотометрическим методом провести определение чистоты и размера молекул ДНК в образце методом агарозного гель-электрофореза.

***7.2.3.2 Оценка количества РНК в образце спектрофотометрическим методом***

– образец РНК предварительно разморозить в термостате;

– включить прибор NanoDrop™ Lite Spectrophotometer;

– выбрать программу «RNA»;

– провести считывание «фона»: а) промыть датчик прибора нанесением 3 мкл дистиллированной воды, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой, б) нанести 2 мкл дистиллированной воды на датчик прибора, провести измерение Blank, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой, в) еще раз нанести 2 мкл дистиллированной воды на датчик прибора, провести второе измерение Blank, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой, г) если считывание «фона» прошло успешно, то прибор выведет на дисплей сообщение «Blank confirmed», д) если считывание «фона» не выполнено, то повторить пункты а)-в) еще раз.

– нанести на датчик 2 мкл образца РНК, провести измерение, зафиксировать письменно величины: коэффициент A260/280, концентрацию РНК в нг/мкл;

– промыть датчик нанесением 2 мкл дистиллированной воды, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой;

– повторить измерение. Нанести на датчик 2 мкл образца РНК, провести измерение, зафиксировать письменно величины: коэффициент A260/280, концентрацию РНК в нг/мкл;

– промыть датчик нанесением 2 мкл дистиллированной воды, затем промокнуть насухо фильтровальной бумагой;

– выключить прибор;

– после оценки количества ДНК в образце спектрофотометрическим методом провести определение чистоты и размера молекул ДНК в образце методом агарозного гель-электрофореза.

***7.2.4. Определение чистоты биоматериала (ДНК, РНК) в образце и размера молекул ДНК, РНК методом агарозного гель-электрофореза***

***7.2.4.1 Определение чистоты и размера молекул ДНК в образце методом агарозного гель-электрофореза***

– образец ДНК предварительно разморозить в термостате;

– залить агарозный гель согласно п. 7.1.3;

– внести в каждую лунку 1%-ного агарозного геля по 1 мкл образца ДНК. В отдельные карманы внести маркер молекулярных масс в каждом ряду дорожек;

– подключить камеру к источнику постоянного электрического тока. Выставить параметры источника. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 6-10 В/см;

– выключить источник тока после завершения электорофореза, отсоединить провода от источника тока, перенести гель на трансиллюминатор гельдокументирующего устройства;

– задокументировать полученную картину распределения длин ДНК в агарозном геле после проведения электрофореза при помощи трансиллюминатора;

– после определения чистоты и размера молекул ДНК в образце методом агарозного гель-электрофореза вернуть образец ДНК в место хранения до непосредственного начала исследования.

***7.2.4.2 Определение чистоты и размера молекул РНК в образце методом агарозного гель-электрофореза***

– образец РНК предварительно разморозить на льду;

– залить агарозный гель согласно п. 7.1.3;

– внести в каждую лунку 1.5%-ного агарозного геля по 3 мкл образца РНК. В отдельные карманы внести маркер молекулярных масс в каждом ряду дорожек;

– подключить отдельную камеру (исключительно для гель-электрофореза образцов РНК) к источнику постоянного электрического тока. Выставить параметры источника. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 3-5 В/см;

– выключить источник тока после завершения электорофореза, отсоединить провода от источника тока, перенести гель на трансиллюминатор гельдокументирующего устройства;

– задокументировать полученную картину распределения длин ДНК в агарозном геле после проведения электрофореза при помощи трансиллюминатора;

– после определения чистоты и размера молекул ДНК в образце методом агарозного гель-электрофореза вернуть образец ДНК в место хранения до непосредственного начала исследования.

***7.2.5. Оценка гемолиза в образце плазмы пациента***

– образец плазмы предварительно разморозить на льду;

– включить прибор Ultrospec 500 pro Visible spectrophotometer;

– перенести аликовту образца плазмы в кювету и провести измерение на длине волны 400 нм;

– задокументировать полученные значения;

***7.3. Завершающий этап***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин;

– инактивацию и уничтожение биообразцов и контейнеров проводят автоклавированием в пакетах для дезинфекции и утилизации медико-биологических отходов. После автоклавирования пакеты выбрасывают как бытовые отходы.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.

**5.СОП-ЛФ-ВРНК-001**

**Выделение РНК из биоматериала пациентов**

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок выделения РНК из биологического материала

1. **Назначение**

Выделение РНК значительно снижает ее деградацию во время хранения.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**КБМЗ** - Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями

1. **Пересмотр**

Данная СОП вводится впервые.

1. **Материалы и оборудование**
   1. **Материалы и реактивы**

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| Автоматическая пипетка вместимостью 20÷200 мкл | «Ленпипет», Россия |
| Автоматическая пипетка вместимостью 100÷1000 мкл | «Ленпипет», Россия |
| [Штатив-подставка для пипеток универсальный на 5 дозаторов](http://www.helicon.ru/catalog/detail.php?IBLOCK_ID=4&SECTION_ID=326&ELEMENT_ID=2223) | «Ленпипет», Россия |
| Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл | Axygen, США |
| Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без фильтра фильтром до 200 и до 1000 мкл | Axygen, США |
| Штатив-подставка для микропробирок и наконечников | SSIbio, США |
| Емкость для дезинфицирующего раствора | VITLAB, ФРГ |
| Мерный цилиндр объемом 50 мл, 100 мл и 1000 мл | VITLAB, ФРГ |
| Фалкон на 10 и 50 мл | Axygen, США |
| Лимонная кислота не менее 99% | Panreac, США |
| Лаурилсаркозин натрия | Serva, ФРГ |
| Перекись водорода | ООО «Росбио», РФ |
| Пакеты полипропиленовые одноразовые с индикаторами стерилизации, для сбора и термической обработки (дезинфекции и утилизации) медико-биологических отходов | АБРИС+, РФ |
| Этанол | ЗАО «База №1 химреактивов», РФ |
| Фенол ультрачистый для молекулярной биологии более 99,7 %, осч | ЗАО «База №1 химреактивов», РФ |
| Хлороформ | ЗАО «База №1 химреактивов», РФ |
| Гуанидин тиоционат не менее 99% | AppliChem, США |
| Натрий лимоннокислый (цитрат) 3-зам. 5,5-водн. 98,0 %, Extrapure, 98,0 % | Panreac, США |
| Натрий додецилсульфат (SDS) 85,0 %, Pharm grade | Panreac, США |
| Соляная кислота 37,0 %, Ph | Panreac, США |
| Трис(гидроксиметил)аминометан 99,9 %, MBG, для молекулярной биологии | Panreac, США |
| Мини-колонки Aurum RNA binding Columns, 50 шт. | Bio-Rad, США |
| Клейкая лента канцелярская Attache прозрачная 19 мм х 33 м (пластиковая втулка) | Attache, Россия |
| Маркер перманентный Paper Mate SHARPIE TWIN TIP, 1 мм | Paper Mate, США |

* 1. **Оборудование**

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Холодильник +4С | Indesit, Италия |
| Кельвинатор -80С | Thermo Scientific, США |
| Бокс биологической безопасности II класса защиты | ЗАО "Ламинарные системы", РФ |
| Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл до 14000 об/мин | Eppendorf, ФРГ |
| Термостатируемый шейкер для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл | Biosan, Латвия |
| Льдогенератор | Koreco, ЮКорея |
| Ультрафиолетовый облучатель | ARMED, Россия |
| Автоклавная установка | ЗАО «Тюменьский завод медицинского оборудования и инструментов», РФ |
| Весы |  |
| рН-метр | Knick, ГДР |
| Дистиллятор | SG-Wasser, Сингапур |
| Источник бесперебойного питания | APC, США |
| Компьютер с принтером | ASUS, Китайская Республика |
| Источник бесперебойного питания 5 кВт | APC, США |

* 1. **Комплект спецодежды**

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется в помещениях лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

1. **Процедура**
   1. **Подготовительный этап**

**7.1.1. Подготовка персонала к проведению работ**

– надеть сменную обувь, медицинский халат и перчатки.

**7.1.2. Подготовка боксового помещения к работе**

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

– подготовить емкость со льдом.

**7.1.3. Подготовка растворов.**

**7.1.3.1. Лизирующий буфер:**

- взвесить 23,6 г гуанидин тиоционата в фальконе на 50 мл; добавить 40 мл MQ, полностью растворить гуанидин тиоцианат (быстрее при +65С);

- взвесить 2,58 г цитрата натрия в стеклянном стакане на 50 мл, добавить 10 мл MQ, размешать, довести кристаллами лимонной кислоты до рН7, перенести в фалькон на 10 мл;

- к раствору гуанидин тиоционата добавить 2,5 мл цитрата натрия рН7 и 0,714 мл лаурил саркозина натрия, перемешать, довести объем раствора до 50 мл, добавив MQ;

- обернуть фалькон с раствором в фольгу, хранить на столе.

Состав лизирующего буфера:

- гуанидин тиоцианат 4М.

- цитрат натрия 1М, рН7.

- лаурил саркозин натрия 0,5% по объему.

**7.1.3.2.** **Фенол водонасыщенный**

- достать бутылку с кристаллическим фенолом из холодильника, согреть до rt, ослабить крышку

- поставить в горячую воду, нагреть до +65с, пока не расплавится.

- заполнить банку фенола деионизованной стерильной водой до горлышка (вообще достаточно 1/5-й от объёма фенола, ведь 100 гр фенола насыщаются 12,36 мл. воды).

- хорошо закрутить крышку и встряхнуть, чтоб водная и органическая фазы образовали качественную эмульсию.

- поставить на +3с, чтоб фазы разделились (в течение 8-16 часов).

- отсосать верхний водный слой.

- разделить фенол на небольшие объёмы (50-100 мл), достаточные для 1-го – 2-х раз использования.

- добавить стерильной деионизованной воды, чтоб покрыть ею слой фенола.

- хранить при +4с защищённом от света месте. Лучше использовать бутылки из стекла янтарного цвета, обёрнутые фольгою. В таком виде фенол будет стабилен несколько месяцев (минимум 3). Замораживать фенол не рекомендуется.

**7.1.3.3. Отмывочный буфер**

- взвесить 1,97 гTris-HCL, перенести в стакан на 50 мл, добавить 40 мл MQ, довести HCL до рН7,4, перенести в фалькон на 50 мл, хранить замороженным на -20С.

- смешать 41,6 мл 96% этанола; 0,5 мл Tris-HCL рН7,4; 7,9 мл MQ.

- хранить на столе.

**7.2. Основной этап**

П.1. образец объемом 100-200 мкл поместите в пробирку на 1,5 мл.

П.2. добавьте 550 мкл лизирующего буфера. Тщательно перемешайте встряхиванием. Сбросьте капли центрифугированием.

П.3. добавьте 500 мкл водного фенола, 100 мкл хлороформа. Тщательно перемешайте встряхиванием.

ВНИМАНИЕ: водный фенол – нижняя желтая фаза двухфазной смеси.

П.4. центрифугируйте образец 15 мин при 12 000 об/мин.

П.5. отберите 600 мкл водной (верхней) фазы в три приема по 200 мкл носиком на 200 мкл в новую 1.5 мл пробирку. Старайтесь отбирать водную фазу медленно, иначе вы захватите интерфазу.

П.6. добавьте 900 мкл этанола, перемешайте.

П.7. поместите колонку в адаптер. Подпишите колонку на крышке.

П.8. перенесите 750 мкл раствора, полученного в п. 6, в корпус колонки, закройте колонку и центрифугируйте 1 мин при 6 000 об/мин.

П.9. удалите проскок (раствор, проскочивший сквозь колонку) из адаптера.

П.10. повторите п. 8-9.

П.11. добавьте 450 мкл отмывочного буфера в корпус колонки, закройте колонку и центрифугируйте 1 мин при 6 000 об/мин

П.12. насухо удалите проскок из адаптера.

П.13. повторите п. 11-12.

П.14. центрифугируйте 3 мин при 12 000 об/мин.

П.15. незамедлительно извлеките колонку из адаптера, убедитесь, что стенки колонки снаружи сухие, перенести колонку, в новую 1,5 мл пробирку (предварительно подпишите пробирку и обрежьте крышку пробирки ножницами, крышку не выбрасывайте!). если стенки колонки снаружи не сухие – повторите п.14.

П.16. добавьте в колонку 80 мкл MQ.

П.17. закройте колонку и инкубируйте при +65ос 3 мин.

П.18. центрифугируйте колонку в пробирке 1 мин при 12 000 об/мин. извлеките колонку из пробирки, закройте пробирку крышкой. Храните РНК до реакции обратной транскрипции при -80°с.

**7.3 Завершающий этап**

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин.

– невостребованные биологические образцы подвергаются списанию, инактивации и уничтожению.

* инактивацию и уничтожение биообразцов и контейнеров проводят автоклавированием в пакетах для дезинфекции и утилизации медико-биологических отходов. После автоклавирования пакеты выбрасывают как бытовые отходы.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.
7. **Нормативные ссылки.**
   * + 1. Методические рекомендации «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований крови» (Одобрены на общероссийской научно-практической конференции «Реальные клинико-диагностические лабораторные услуги: степень соответствия стандартам лабораторной медицины, качество, себестоимость и цена» (Москва, 2-4 октября 2012 г.)
       2. ГОСТ Р 53079.4─2008. «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». Введен в действие с 1.01.2010 года.
       3. СанПин 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных заболеваний»
       4. «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
       5. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», 2009 г.

**СОП-ЛФ-6.ВиП-001**

**Выделение циркулирующей ДНК из плазмы**

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок выделения циркулирующей внеклеточной ДНК из плазмы пациентов, депонированной в КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

1. **Назначение**

Получение препаратов нуклеиновых кислот из плазмы является заключительным этапом включения образца в Коллекцию биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**КБМЗ** - Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями

**Оператор** – сотрудник лаборатории, в должностные обязанности которого входит проведение и обеспечение работ по выделению нуклеиновых кислот из плазмы.

1. **Пересмотр**

Данная СОП вводится впервые.

1. **Материалы и оборудование**
   1. ***Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| Водорода перекись, медицинская | ГОСТ 177-88 |
| Дезинфицирующее средство «Ника-Хлор», 3 упак. | ООО «Волга Снаб», Россия |
| Дистиллированная вода (MQ) | ГОСТ 6709-72 |
| Контейнер КДС-КРОНТ, 2 штуки | ООО «Волга Снаб», Россия |
| Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья | ГОСТ 5962-2013 |
| Спирт изопропиловый | ГОСТ 9805-84 |
| Буфер фосфатно-солевой (порошок) PBS 5л 10Х, 1 шт | Santa Cruz Biotechnology, США |
| Мерные цилиндры вместимость 50 мл, 1000 мл, 4 штуки | ГОСТ 1770-74 |
| Штатив на 15 мл, 40 мест, полипропилен, d 20 мм, 2 штуки | Deltalab, Испания |
| Штатив для пробирок 1,5-2 мл на 50 мест, полистирол, 2 штуки | Axygen, США |
| Наконечники универсальные для дозаторов объемом до 200 мкл, желтые с фаской, T-200-Y | Axygen, США |
| Наконечники до 1000 мкл (от 100 мкл), голубые | Axygen, США |
| Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 1,5 мл | Axygen, США |
| Пробирки Roche cell-free DNA collection tube LOT A160634C | Roche, Швейцария |
| Пробирки 15 мл, ПП, резьбовые, конические, с крышкой | Axygen, США |
| Набор QIAamp Circulating Nucleic Acid, 20 кор | Qiagen, Нидерланды |
| Автоматическая пипетка 1-10 мкл, 1 шт. | Thermo Scientific, США |
| Автоматическая пипетка 10-100 мкл, 1 шт. | Thermo Scientific, США |
| Автоматическая пипетка 100-1000 мкл, 1 шт. | Thermo Scientific, США |

* 1. ***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Шкаф лабораторный вытяжной с блоком УФ-облучения | ЗАО "ЛАМИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ", Россия |
| Холодильник (+40С) для хранения биоматериала (кровь), 2 штуки | Indesit, Италия |
| Морозильник низкотемпературный (-800C)для хранения биоматериала (плазма) | Thermo Scientific, США |
| Морозильник низкотемпературный (-800C)для хранения биоматериала (нуклеиновые кислоты) | Thermo Scientific, США |
| Центрифуга Eppendorf 5810R | Eppendorf, Германия |
| Термостат твердотельный TS-100, с перемешиванием, с термоблоком SC-24N | Biosan, Латвия |
| Термостат электрический суховоздушый ТС-1/20 СПУ | Компания ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия |
| Вакуумный коллектор QIAvac 24 Plus | Qiagen, Нидерланды |
| Соединяющая система QIAvac | Qiagen, Нидерланды |
| Вакуумный насос, (230 V, 50 Hz) | Qiagen, Нидерланды |
| Центрифуга Heraeus Pico 17 с 24х местным ротором для пробирок 1,5/2 мл с герметичной защелкивающейся крышкой, без адапторов | Heraeus, Германия |
| Вортекс | Advanced Vortex Mixer Talboys, Troemner, США |
| Дистиллятор | SG-Wasser, Сингапур |

* 1. ***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется на базе лаборатории фармакогеномики ИХБФМ.

1. **Процедура**
   1. ***Подготовительный этап***

***7.1.1. Подготовка персонала к проведению работ***

– надеть халат медицинский, перчатки, колпак и маску. Дальнейшую работу вести в условиях ламинарного вытяжного шкафа с блоком УФ-облучения.

***7.1.2. Приготовление дезинфицирующего раствора***

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

- приготовить рабочий раствор дезинфицирующего средства «Ника-Хлор» согласно инструкции производителя, в частности для медицинских отходов в случае работы с биологическими выделениями (кровь) необходимо 4/7 таблеток на 10 литров воды с экспозицией 240/60 минут.

***7.1.3. Подготовка боксового помещения к работе***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

***7.1.4. Приготовление буфера ACB***

Перед использованием, добавьте 200 мл изопропанола (100%) к 300 мл концентрированного буфера ACB для получения 500 мл готового буфера ACB. Хорошо перемешайте.

***7.1.5. Приготовление буфера ACW1***

Перед использованием, добавьте 25 мл этанола (96-100%) к 19 мл концентрированного буфера ACW1 для получения 44 мл готового буфера ACW1. Хорошо перемешайте.

***7.1.5. Приготовление буфера ACW2***

Перед использованием, добавьте 30 мл этанола (96-100%) к 13 мл концентрированного буфера ACW2 для получения 43 мл готового буфера ACW2. Хорошо перемешайте.

***7.1.6. Добавление РНК-носителя к буферу ACL***

Добавить 1550 мкл буфера AVE в пробирку, содержащую 310 мкг лиофилизированного РНК-носителя (конечная концентрация РНК-носителя 0,2 мкг/мкл). Растворите РНК-носитель полностью, разделите его на аликвоты с удобными размерами и храните их при температуре от -15 до -30 ° C. Не замораживайте-оттаивайте аликвоты несущей РНК более трех раз. Обратите внимание, что РНК-носитель не растворяется в буфере ACL. Сначала она должна быть растворена в буфере AVE, а затем добавлена в буфере ACL. Перед выделением рассчитайте объем буфера ACL с РНК-носителем, необходимый для каждой партии образцов в соответствии с таблицами в инструкции. Смешайте буфер ACL и РНК-носитель, аккуратно перемешайте, во избежание вспенивания – не встряхивайте.

***7.2. Основной этап***

***7.2.1. Получение плазмы***

- Необходимое, кратное количество образцов крови достать из холодильника (на +40C), поставить в рабочий штатив;

- Остальные образцы немедленно убрать обратно в холодильник, на +40C;

- Образцы крови центрифугировать при 2000g в течение 10 минут;

- Перенести плазму в новую пробирку на 15 мл и повторить центрифугирование (10 минут, 2000g);

- После второго центрифугирования разаликвотировать плазму по 1000 мкл в микроцентрифужные градуированные предварительно подписанные пробирки объемом 1,5 мл, и хранить в низкотемпературном холодильнике, обеспечивающем постоянное поддержание температуры на уровне минус 78 - 800С.

- В случае передачи в коллекцию КБМЗ ИХБФМ СО РАН уже готовых образцов плазмы, использовать для выделения нуклеиновых кислот аликвоту (1000 мкл).

Оставшиеся после центрифугирования осадки подвергаются инактивации и уничтожению.

***7.2.3. Выделение нуклеиновых кислот из плазмы***

Для выделения нуклеиновых кислот из плазмы оператор достает по одной аликвоте образца из низкотемпературного холодильника, и отмечает ее идентификационный номер в рабочем журнале. Идентификационный номер должен соответствовать номеру в базе данных КБМЗ ИХБФМ СО РАН и состоять как минимум из 3-х цифр и двух букв.

Максимальное рекомендуемое количество выделяемых из плазмы образцов не должно превышать 24 штук.

Непосредственное выделение нуклеиновых кислот из плазмы оператором проводится строго по протоколу производителя (EN) - QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook (Qiagene, Нидерланды).

1. Добавьте 100 мкл QIAGEN Proteinase K в 50 мл пробирки для центрифугирования.

2. Добавьте 1 мл плазмы в 50 мл пробирки для центрифугирования.

3. Добавьте 0,8 мл буфера ACL (содержащий 1,0 мг носителя РНК). Закройте крышку и перемешайте на пульс-вортексе в течении 30 секунд. Убедитесь визуально, что смесь перемешена. Для обеспечения эффективного лизиса необходимо, чтобы образец и буфер ACL тщательно перемешивались, чтобы получить однородный раствор.

Примечание. Не прерывайте процедуру в это время. Перейдите сразу к шагу 4, чтобы начать лизис.

4. Инкубируйте при 60°C в течении 30 минут.

5. Поместите пробирку обратно на лабораторный стол в планшет и отвинтите колпачок.

6. Добавьте 1,8 мл буфера ACB к лизату в пробирке, закройте крышку и перемешайте на пульс-вортексе в течении 15-30 сек.

7. Инкубируйте смесь лизат-буфер ACB в пробирке в течении 5 минут на льду.

8. Вставьте колонку QIAampMini в VacConnector на QIAvac 24 Plus. Вставьте удлинитель

20 мл в открытую колонку QIAamp Mini. Убедитесь, что удлинитель прочно вставлен в колонку QIAamp Mini, чтобы избежать утечки образца. Примечание. Сохраните пробирку для шага 13.

9. Осторожно добавьте смесь лизат-буфер ACB из пробирки на шаге номер 7 в колонку QIAamp Mini. Включите вакуумный насос. Когда все лизаты полностью пройдут через колонку, выключите вакуумный насос и отпустите давление до 0 мбар. Осторожно удалите и выбросьте удлинитель. Для быстрого и удобного сброса вакуумного давления необходимо использовать вакуумный регулятор (часть системы подключения QIAvac). Примечание. Чтобы избежать перекрестного загрязнения, будьте осторожны, не допускайте перемещения удлинителей по соседним QIAamp Mini колонкам.

10. Добавьте 600 мкл буфера ACW1 в QIAamp Mini колонки. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После этого пропустите буфер ACW1 сквозь колонку QIAamp Mini, выключите вакуумный насос и отпустите давление до 0 мбар.

11. Добавьте 750 мкл буфера ACW2 в колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После этого пропустите буфер ACW2 сквозь колонку QIAamp Mini, выключите вакуумный насос и отпустите давление до 0 мбар.

12. Добавьте 750 мкл этанола (96-100%) в колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите помпу вакуумного насоса. После этого пропустите буфер ACW2 сквозь колонку QIAamp Mini, выключите вакуумный насос и отпустите давление до 0 мбар.

13. Закройте крышку колонки QIAamp Mini. Удалите VacConnector из вакуумного коллектора и выбросьте его. Поместите колонку QIAamp Mini в пробирку из шага 8 и центрифугируйте при 20 000g в течение 3 минут.

14. Поместите колонку QIAamp Mini в новую пробирку объемом 2 мл. Откройте крышку и инкубируйте при 56 ° C в течение 10 минут, чтобы полностью высушить мембрану.

15. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую пробирку на 1,5 мл и выбросите пробирку с этапа 14. Осторожно нанесите 20-150 мкл буфера AVE в центр мембраны QIAamp Mini. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре в течение 3 мин.

Важно: Убедитесь, что буфер элюирования AVE прогрет до комнатной температуры

(15-25°С). Если элюирование проводят небольшими объемами буфера AVE (<50 мкл), буфер следует распределить по центру мембраны для полного элюирования связанной ДНК. Объем элюирующего буфера AVE может быть адаптирован в соответствии с требованиями последующего анализа. Объем элюата будет на 5 мкл меньше объема буфера AVE, нанесённого на колонку QIAamp Mini.

16. Центрифугируйте в микроцентрифуге на полной скорости (20 000g) в течение 1 мин для элюирования нуклеиновых кислот.

По окончании процедуры выделения оператор должен отметить номера выделенных образцов и дату выделения нуклеиновых кислот в базе данных КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

***7.3 Хранение образцов нуклеиновых кислот***

Выделенные нуклеиновые кислоты из плазмы, находящиеся в микроцентрифужных пробирках на 1,5 мл, оператор должен поставить в штативы и хранить в низкотемпературном холодильнике, обеспечивающем постоянное поддержание температуры на уровне минус 78 - 800С.

За работой холодильного оборудования осуществляется систематический визуальный контроль. Показания встроенных датчиков температуры, отражающих температуру внутри холодильников, не менее двух раз за рабочую смену регистрируют в специальных контрольных листах. Кроме того, используемые модели морозильников снабжены звуковыми сигнальными устройствами «Alarm», которые включаются в случае повышения температуры внутри морозильной камеры до минус 65—680С, что позволяет своевременно принять меры к сохранности биологических материалов.

Длительность хранения образцов биологического материала при соблюдении рекомендованного температурного режима не ограничена.

При аварийном отключении электроэнергии и размораживании холодильной камеры составляют акт о нарушении хранения образцов биологического материала. Биологические образцы с утраченными аттестационными характеристиками подвергаются списанию, инактивации и уничтожению.

***7.3.1. Инактивация и уничтожение биологических образцов***

Для дезинфекционной обработки пробирок, содержащих образцы биологических материалов по окончании работы с ними (пробирки со сгустками крови, сывороткой или плазмой крови, одноразовые капилляры и другое) используют разрешенные к применению дезинфицирующие средства из числа рекомендованных соответствующими нормативными документами (СП 1.3.2322-08) или физические методы дезинфекции с помощью оборудования, разрешенного для этих целей в установленном порядке.

Для дезинфекции выделений (кровь) и используют в основном хлорактивные средства (например, Дезинфицирующее средство «Ника-Хлор»). Для этого пробирки со сгустками крови замачивают в заранее приготовленном растворе «Ника-Хлор» (см. выше).

Дезинфекция выделений, крови, мокроты и др. проводится также сухими хлорактивными ДС (хлорная известь, кальция гипохлорит нейтральный и пр.), в этом случае дезинфицирующее средство «Ника-Хлор» размельчить до гранул и использовать 50/80/100 г на 1 л выделений (кровь) с экспозицией 90/60/30 минут. Данный метод можно применить вэкстренных ситуацияхи при невозможности приготовления растворов: пролитую кровь можно засыпать гранулами «Ника-Хлор» и оставить до полного впитывания. После чего собрать использованный порошок и утилизировать как медицинские отходы.

Все дезинфекционные работы осуществляют в специальных контейнерах (Контейнер КДС-КРОНТ) путем полного погружения обрабатываемых материалов в дезинфицирующий раствор (Дезинфицирующее средство «Ника-Хлор»), с соблюдением заполнения раствором всех внутренних полостей обрабатываемых материалов; во время дезинфицирующей обработки контейнеры должны быть закрыты крышками. Вытряхивание необеззараженного сгустка крови из пробирки (флакона) запрещается. При погружении в дезинфицирующий раствор емкостей со сгустками крови необходимо соблюдать осторожность. Емкость берут анатомическим пинцетом так, чтобы одна его бранша вошла немного внутрь, и погружают ее в наклонном положении до полного заполнения раствором. При правильном погружении воздушные пузыри не образуются и емкость опускается на дно. После погружения всех емкостей пинцет обеззараживают (пункт в редакции, введенной в действие с 1 августа 2009 года [Дополнениями и изменениями N 1 от 2 июня 2009 года](http://docs.cntd.ru/document/902165869)).

По окончании времени обработки указанные материалы извлекают из контейнеров и после стекания дезинфицирующей жидкости упаковывают в пластиковые или бумажные пакеты, которые передают для обработки текучим паром в автоклаве (в соответствии с распорядком работы дезинфекционной службы). При автоклавировании достигается не только дополнительная дезинфекция, но и деформация (плавление и спекание) отдельных фрагментов изделий, что не позволяет их использовать повторно.

***7.4. Завершающий этап***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать вытяжной шкаф и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин

– перед использованием штатива, его необходимо замочить в 6% растворе перекиси водорода в контейнере КДС-КРОНТ, избегая образования воздушных пробок. Экспозиция не менее 6 ч.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.
7. **Нормативные ссылки.**
   * + 1. Методические рекомендации « Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований крови» (Одобрены на общероссийской научно-практической конференции «Реальные клинико-диагностические лабораторные услуги: степень соответствия стандартам лабораторной медицины, качество, себестоимость и цена» (Москва, 2-4 октября 2012 г.)
       2. ГОСТ Р 53079.4─2008. «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». Введен в действие с 1.01.2010 года.
       3. СанПин 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных заболеваний»
       4. СП 1.3.2518-09 Дополнения и изменения N 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08"
       5. «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
       6. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», 2009 г.

Ссылка на сайт производителя с инструкцией протокола выделения: <https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=0c4b31ab-f4fb-425f-99bf-10ab9538c061&lang=en>