

<b>ФГБНУ ВНИИСПК</b>	
СОП №37 от 27.09. 2017г.	Стандартная операционная процедура <b>ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ПЦР ПРОДУКТОВ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ</b>
Цель СОП:	Упорядочить процесс <b>проведения анализа ПЦР продуктов в агарозном геле</b>
Разработчик:	Пикунова А.В.
Рабочее место:	Лаборатория биохимической генетики
Утверждено:	
Разработано на основании:	ГОСТ Р 52173-2003

№	Описание операции	Время выполнения на один образец	Используемые материалы и приборы
1	Приготовление смеси для нанесения на гель: 4 г сахарозы развести в 10 мл 1хТВЕ, добавить бромфеноловый синий до конечной концентрации 0, 25%	5мин	Пара нитриловых перчаток, весы лабораторные, емкость с закручивающейся крышкой на 10 мл, стеклянная палочка для помешивания, шпатель
2	Добавить смесь для нанесения на гель к образцам из соотношения 8мкл ПЦР продукта и 2 мкл смеси для нанесения. Перемешать на вортексе и отцентрифугировать.	30сек	Дозатор до 10 мкл ( при большом количестве образцов удобно использовать многоканальный дозатор, наконечники до10 мкл, пробирки 0,2 мл или плашки Центрифуга-вортекс, Настольная центрифуга ( если большое количество образцов и используются плашки)
3	Приготовить 1,7% агарозный гель: В мерную колбу на 200мл взвесить 1,7г агарозы, довести 1хТВЕ до метки 100 мл. Поместить в микроволновую печь, нагревать, периодически помешивая, до закипания и полного расплавления агарозы до прозрачного состояния.	15сек 15сек 5мин	мерная колба на 200мл, весы лабораторные, шпатель, 1х ТВЕ, микроволновая печь
4	Охладить в водяной бане или под струей воды до 50 С. Добавить 1,5 мл бромистого этидия, аккуратно перемешать не вызывая образования в геле пузырьков.	5мин (под струей воды) 30сек	Водяная баня, Дозатор до 10 мкл, наконечник
5	Заранее подготовить столик для заливки геля, выровнять его по уровню, вставить необходимое количество гребенок. Быстро залить гель. При необходимости убрать пузырьки воздуха тонким наконечником. Полимеризация геля занимает 40мин-1 час.	30сек  15сек  15сек  Полимеризация геля - 40мин-1 час	столик для заливки геля, уровень, гребенки, наконечник до 10 мкл

6	<p>Нанесение образцов на гель: Записать порядок расположения образцов на дорожках геля. Вынуть из геля гребенки, поместить его на подложке в камеру для электрофореза заполненную охлажденным 1хТВЕ. Используя одноканальный дозатор до 10 мкл нанести по 10 мкл смеси, на каждую дорожку нанести так же 7 мкл маркера молекулярного веса.</p>	<p>10сек  15сек  15сек  10сек   10сек</p>	<p>Ручка, рабочий журнал, 1хТВЕ, камера для проведения горизонтального электрофореза типа SE-2, одноканальный дозатор до 10 мкл, наконечники до 10 мкл, 1хТВЕ</p>
7	<p>Проведение горизонтального электрофореза: Закрыть камеру крышкой, проверить верность направления движения фрагментов в сторону анода (положительного заряженного электрода). Включить источник тока, выставить 120 - 150 В по напряжению. Проводить электрофорез 40-60 мин. Выключить источник тока.</p>	<p>1мин       40-60мин- проведение электрофореза</p>	<p>камера для проведения горизонтального электрофореза, источник тока типа Блок питания НИП3000</p>
8	<p>Положить гель на трансиллюминатор(без подложки), закрыть защитным стеклом, включить лампу на мощность 70% для просмотра, использовать защитные очки.</p>	<p>1мин</p>	<p>Трансиллюминатор типа ECX-F20.M 9VILBER LOURMART, защитные очки</p>
9	<p>Установить капюшон для фотографирования геля. Разместить фотоаппарат. Включить трансиллюминатор на мощность 100. Сфотографировать гель без вспышки ( рис ).</p>	<p>15сек  15сек</p>	<p>Капюшон для фотографирования гелей, фотоаппарат с картой памяти</p>
10	<p>Изображения скопировать на компьютер и дополнительный носитель информации, дав название в соответствии с анализируемым локусом и страницей с соответствующим протоколом проведения анализа в рабочем журнале.</p>	<p>7мин</p>	<p>Компьютер, карта памяти</p>

Визуализация:

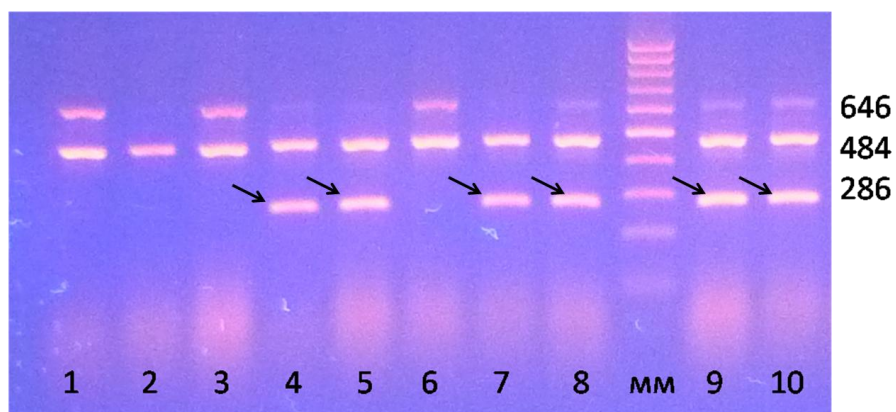


Рис.1 Электрофореграмма ПЦР продуктов амплификации ДНК сортообразцов яблони с праймерами маркера VfC (1-10 сортообразцы, мм – маркер молекулярного веса Gene Pak DNA LadderM-100). Наличие фрагмента 286 п.н. свидетельствует о присутствии гена Vf, Справа указаны размеры фрагментов, п.н. .

Суммарная длительность СОП для анализа 1 образца: 108 мин, включая 40 мин – на полимеризацию геля, 40 мин – проведение электрофореза.

Как правило, проводится анализ сразу нескольких образцов, при этом, время затраченное на 1 образец в целом сокращается.

Квалификация сотрудника:  
М.н.с. или ст.н.с.

#### Оборудование

Наименование	Типовая модель	Производитель	Каталожный номер (web-адрес)
Центрифуга-вортекс	Тета-2	Биокон, РФ	<a href="http://www.8a.ru/print/1875.php">http://www.8a.ru/print/1875.php</a>
Одноканальный дозатор до 10мкл	Discovery Comfort	HTL,	HTL-DV*** <a href="https://www.laboratorii.com/oborudovanie-dlja-laboratorij/odnokanalnye-peremennogo-obema/avtomaticheskie-odnokanalnye-dozatory-discovery-comfort-peremennogo-obema-ntl/">https://www.laboratorii.com/oborudovanie-dlja-laboratorij/odnokanalnye-peremennogo-obema/avtomaticheskie-odnokanalnye-dozatory-discovery-comfort-peremennogo-obema-ntl/</a>
Холодильник	DSK 251	ВЕКО, Турция	71003623 <a href="https://www.eldorado.ru/cat/detail/71003623/">https://www.eldorado.ru/cat/detail/71003623/</a>
Центрифуга с ротором R-2 под 96 луночные плашки	LMC-3000	BioSan, Латвия	<a href="http://tehmedtorg.ru/produksiya/biosan/lmc-3000">http://tehmedtorg.ru/produksiya/biosan/lmc-3000</a>
Весы лабораторные	Scout Pro SPU 202	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ USA	
Многоканальный дозатор до 10 мкл	Discovery Comfort	HTL	
Микроволновая печь	ME81MRT B	Samsung, Малайзия	
Водяная баня	UT-4312	ULAB, Россия	

Камера для проведения горизонтального электрофореза	SE-2	Helicon	
источник тока типа Блок питания	НИП3000	Биоком, РФ	
Трансиллюминатор	ECX-F20.M 9VILBER LOURMART	France	
Капюшон для фотографирования гелей			
фотоаппарат	Power shot Sx210 IS	Canon	
карта памяти фотоаппарата	SDHC 16gb Class 10	Transcend	
Компьютер			
Карта памяти	8гВ	Transcend	
Гребенки			

#### Расходные материалы и личные средства защиты

Наименование	Много- /одноразовый	производитель	Каталожный номер (web-адрес)
Халат лабораторный	Многоразовый	любой	VAE-W <a href="http://technologicalsystems.ru/antistatic_clothes/robe_vae-w.php">http://technologicalsystems.ru/antistatic_clothes/robe_vae-w.php</a>
Перчатки нитриловые	Одноразовые, могут использоваться в течение дня	любой	<a href="http://stomatolog-servis71.ru/perchatki-manual-sn209-m-nitrilovye-smotrovye.html">http://stomatolog-servis71.ru/perchatki-manual-sn209-m-nitrilovye-smotrovye.html</a>
емкость с закручивающейся крышкой на 10 мл,	многоразовый	любой	
стеклянная палочка для помешивания	многоразовый	любой	
Штатив под пробирки 0,2- 0,5 мл	Многоразовый	любой	# RA-10005 <a href="https://www.dia-m.ru/plastic/shtativy-dlya-probiroktipa-eppendorf/russia-ra-10005-shtativ-rabochee-mesto-dlya-probirok-05-ml/">https://www.dia-m.ru/plastic/shtativy-dlya-probiroktipa-eppendorf/russia-ra-10005-shtativ-rabochee-mesto-dlya-probirok-05-ml/</a>
мерная колба на 200мл	многоразовый	любой	

шпатель	многоразовый	любой	
ручка	многоразовый	любой	
Рабочий журнал	многоразовый	любой	
Наконечники для дозаторов до 10 мкл	Одноразовый	любой	HT-10-960 <a href="https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/bez-filtra/203/?sphrase_id=38704">https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/bez-filtra/203/?sphrase_id=38704</a>
защитные очки	многоразовый	любой	# 9100 1001 1 <a href="http://dia-m.ru/lab/transillyuminatory-i-sistemy-gel-dokumentirovaniya/acs/11345/">http://dia-m.ru/lab/transillyuminatory-i-sistemy-gel-dokumentirovaniya/acs/11345/</a>
Пробирки 0,2 мл	Одноразовый	любой	SSI-3320-00 <a href="https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/probirki-dlya-ptsr-obemom-0-5-ml/283/">https://www.laboratorii.com/laboratornyj-plastik/probirki-dlya-ptsr-obemom-0-5-ml/283/</a>
Стрипы с крышками	Одноразовый	любой	PCR-0208-C <a href="http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1353&amp;id=6981">http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1353&amp;id=6981</a>
Плашки 96 луночные для ПЦР	Одноразовый	любой	PCR-96-C <a href="http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1360&amp;id=7055">http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1360&amp;id=7055</a>
Пленка клейкая для плашек 96 луночных	Одноразовый	любой	PCR-TS <a href="http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1360&amp;id=7057">http://www.interlabservice.ru/catalog/plastik/?sid=1360&amp;id=7057</a>