


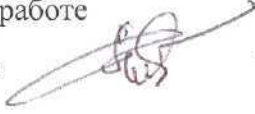





 <p>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»</p>	<p>ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России</p>
---	---------------------------------------

МЕТОДИКА			
Скрининг мутаций indel в гене CALR			
<p>РАЗРАБОТАЛИ:</p> <p>Заведующий лабораторией цитогенетики</p> <p>дата 31.10.2018 подпись  В.А. Овсебян</p> <p>Младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии</p> <p>дата 31.10.2018 подпись  Е.В. Трегубова</p> <p>СОГЛАСОВАЛИ:</p> <p>Заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии</p> <p>дата 31.10.18. подпись  Е.Л. Назарова</p> <p>Заместитель директора по научной работе</p> <p>дата 09.11.2018 подпись  А.В. Рылов</p> <p>Ученый секретарь</p> <p>дата 01.11.2018 подпись  М.Е. Ковтунова</p> <p>Заместитель директора по лечебной работе</p> <p>дата 1.11.2018 подпись  Н.В. Минаева</p> <p>Помощник директора по лабораторной деятельности</p> <p>дата 06.11.2018 подпись  А.Л. Попцов</p> <p>Начальник отдела обеспечения качества</p> <p>дата 01.11.2018 подпись  Е.Н. Калинина</p> <p>УТВЕРДИЛ:</p> <p>Директор</p> <p>дата 12.11.18 подпись  И.В. Парамонов</p>	<p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">М-КЛД-27-015</p> <p>Дата введения: <i>12.11.2018</i></p> <p>Дата пересмотра: <i>12.11.2023</i></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 2px;">Версия 1</td> <td style="width: 50%; padding: 2px;">С. 1/14</td> </tr> </table> <div style="border: 2px solid blue; padding: 5px; text-align: center; color: blue; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">ОРИГИНАЛ</div> <p style="text-align: center; color: blue; font-style: italic;">Экземпляр №1</p> <p style="text-align: center; font-size: 0.8em;">Место для штампа</p>	Версия 1	С. 1/14
Версия 1	С. 1/14		

ВНИМАНИЕ!

Этот документ разрешен к использованию до вступления в силу следующей версии.
Использование отмененных или устаревших документов запрещается.
Ответственность по проверке действительности данного документа
перед каждым его использованием возлагается на пользователя.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Настоящий документ разработан и предназначен для пользования работниками
ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.
Пользователь документа не имеет права передавать документ лицам,
не являющимся работниками ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 2/14

Содержание

1	Цель	3
2	Область применения	3
3	Ответственность	3
4	Общие положения	3
5	Персонал	4
6	Помещения	4
7	Оборудование	5
8	Материалы	5
9	Подготовка к выполнению исследования	6
10	Постановка полимеразной цепной реакции для выявления мутаций типа indel в гене <i>CALR</i>	6
11	Электрофоретическое разделение продуктов полимеразной цепной реакции « <i>CALR</i> » в полиакриламидном геле	8
12	Требования безопасности	10
13	Нормативные ссылки	10
14	История документа	10
	Приложение А	11
	Лист ознакомления	13
	Лист рассылки	14

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 3/14

1 ЦЕЛЬ

1.1 Настоящий Документ описывает последовательность этапов выявления соматических мутаций типа indel в гене *CALR* в клетках периферической крови методом полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) в лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии (далее – ЛКМИ) ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России (далее – Учреждение).

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

2.1 Действие настоящего Документа распространяется на персонал ЛКМИ Учреждения, задействованный в молекулярно-генетических исследованиях.

3 ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

3.1 Ответственность за разработку, оформление, своевременную актуализацию настоящего Документа несет заведующий ЛЦ.

3.1 Ответственность за выполнение требований настоящего Документа несут все сотрудники ЛКМИ Учреждения, занимающиеся молекулярно-генетическими исследованиями.

3.2 Контроль за соблюдением требований настоящей Методики возлагается на заведующего ЛКМИ.

3.3 Ответственность за получение патента на настоящую Методику несет заведующий лабораторией цитогенетики.

4 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4.1 Разработка, оформление и кодирование настоящего Документа проводится согласно инструкциям И-Д-13-013 «Требования к оформлению и изложению внутренних документов системы менеджмента качества» и И-Д-13-002 «Требования к кодированию внутренних документов системы менеджмента качества».

4.2 Выявление соматических мутаций в генах янускиназы-2 (JAK2), кальретикулина (*CALR*) и рецептора тромбопоэтина (MPL) в пробах венозной крови включено в клинические рекомендации ВОЗ в качестве одного из основных диагностических критериев классических Ph-негативных миелопролиферативных неоплазий (МПН). Их обнаружение свидетельствует о клональном характере заболевания и помогает в дифференциальной диагностике истинной полицитемии (ИП), эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) и первичного миелофиброза (ПМФ) от ряда других миелоидных неоплазий, а также вторичных эритроцитозов и тромбоцитозов.

4.3 Кальретикулин (Calreticulin, *CALR*) представляет собой многофункциональный кальций-связывающий белок эндоплазматического ретикулума. Кроме регуляции внутриклеточной концентрации кальция, этот белок принимает участие в формировании третичной структуры белков, обладая функциями шаперона. При его участии происходит образование полноценного антигенпрезентирующего макромолекулярного комплекса MHC1.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 4/14

4.4 Повышенная экспрессия гена *CALR* сопряжена с успешной иммунной цитотоксической реакцией против опухолевых клеток и определяет благоприятный исход химиотерапии. Наличие мутации в гене *CALR* ведет к активации моноцитов, способствуя выработке провоспалительных цитокинов, многие из которых участвуют в регуляции передачи сигнала по JAK/STAT пути. Активация сигнального пути JAK/STAT занимает центральное место в патогенезе миелопролиферативных заболеваний.

4.5 Показанием для проведения скрининга на наличие мутации в гене *CALR* является подозрение на ЭТ или ПМФ и отрицательный результат тестирования на мутацию V617F в гене *JAK2*. Мутации в гене *CALR* обнаруживаются в 70 % случаев *JAK2*-негативной ЭТ и в 60 – 80 % случаев *JAK2*-негативного ПМФ. Все обнаруженные до сих пор мутации гена *CALR* при МПН включали экзон 9, который кодирует С-концевой домен, позволяющий связывать Ca^{2+} и KDEL-сигнал, являющийся мотивом сохранения эндоплазматического ретикулула. Почти все мутации представляют собой инсерции и делеции, которые приводят к сдвигу рамки считывания на 1 п.о. К наиболее распространенным вариантам мутаций гена *CALR* относятся p.L367fs*46 и p.K385fs*47, являющиеся результатом соответственно делеции в 52 п.о. (тип 1) и инсерции в 5 п.о. (тип 2). Эти мутации вызывают потерю большей части С-концевого домена и сигнала KDEL, вследствие чего нарушается Ca^{2+} -связывающая функция мутантного белка и изменяется внутриклеточная локализация белка.

4.6 Обнаружение мутаций гена *CALR* в большинстве опубликованных сообщений осуществляется с помощью метода ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру, который является одним из методов золотого стандарта для обнаружения мутаций. Однако данный подход является дорогостоящим, трудоемким и недостаточно чувствительным. Известны также другие методические подходы к выявлению указанных мутаций, такие как фрагментный анализ с применением капиллярного электрофореза и анализ плавления с высоким разрешением (HRM – high resolution melting). Но эти подходы требуют дорогостоящих оборудования и расходных материалов. В отличие от них нами предложенный методический подход характеризуется простотой и низкой стоимостью исследования.

5 ПЕРСОНАЛ

5.1 Младший научный сотрудник ЛКМИ выполняет постановку полимеразной цепной реакции, детекцию результатов ПЦР с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле, интерпретацию и выдачу результатов.

5.2 Препаратор осуществляет сбор и удаление отходов всех классов опасности.

6 ПОМЕЩЕНИЯ

6.1 Для реализации методики задействуются помещения лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии.

6.2 Помещения лаборатории организованы и оснащены в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 5/14

7 ОБОРУДОВАНИЕ

7.1 Для проведения ПЦР:

- ДНК-амплификатор с реакционным блоком С1000 «С1000 Thermal Cycler» фирмы Bio-Rad;
- два ПЦР-боксы с УФ-облучением;
- центрифуга/вортекс для пробирок типа «Эппендорф» со скоростью вращения до 3500 об./мин. (например, «Мульти-Спин», Латвия);
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет» Россия, «Eppendorf» Германия);
- морозильная камера с температурным режимом не выше минус 16°C;
- низкотемпературный морозильник с температурным режимом не выше минус 68°C (например, «Sanyo» Япония).

7.2 Для детекции продуктов амплификации:

- камера для вертикального электрофореза (например, VE-2М «Хеликон», Россия);
- источник питания «Эльф-4»;
- гель-документирующая система (например, Doc-Print «VILBER-LOURMAT», Франция);
- трансиллюминатор (например, TCP-20М «VILBER-LOURMAT», Франция);
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет» Россия, «Eppendorf» Германия);
- холодильник с морозильной камерой с температурным режимом от 2 до 8 °С и не выше минус 16 °С соответственно.

8 МАТЕРИАЛЫ

8.1 Расходные материалы:

8.1.1 Для постановки ПЦР:

- одноразовые полипропиленовые микропробирки типа «Эппендорф» для ПЦР объемом 0,6 и 0,2 мл с плоской крышкой, нестрипованные (например, «Axygene» США);
- одноразовые наконечники для микропипеток до 20, 200 и 1000 мкл (например, «Axygene» США);
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 20 мкл (например, «Axygene» США);
- штативы для наконечников (например, «Axygene» США);
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сбора наконечников.

8.1.2 Для детекции продуктов амплификации:

- одноразовые полипропиленовые микропробирки типа «Эппендорф» объемом 0,2мл (например, «Axygene» США);
- одноразовые наконечники для микропипеток до 20, 200 и 1000 мкл (например, «Axygene» США);
- шприцы объемом 10 мл и 20 мл;
- штативы для наконечников (например, «Axygene» США);
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сбора наконечников.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 6/14

8.2 Реактивы:

8.2.1 Для постановки ПЦР:

- 10x Taq-буфер с KCl;
- раствор 25 mM MgCl₂;
- 10 mM dNTP (водный раствор, pH 7,0);
- специфичные праймеры (10 мкМ), будут указаны в патенте на методику;
- Hot Start Taq ДНК-полимераза (1000 е.а.);
- вода деионизованная для ПЦР.

8.2.2 Для детекции продуктов амплификации:

- акриламид (ХЧ/ОСЧ);
- бис-акриламид (ХЧ/ОСЧ);
- аммония персульфат;
- TEMED (N,N,N,N – тетраметилэтилендиамин);
- этидиум бромид (бромистый этидий);
- TBE-буфер (10x, 1x), приготовленный согласно Приложению А к настоящему

Документу;

- буфер для нанесения на электрофорез;
- ДНК-маркеры молекулярной массы (50bp DNA Ladder);
- дистиллированная вода.

9 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1 Данное лабораторное исследование планируют у тех больных, у которых был проведен анализ мутационного статуса гена *JAK2*, и не была обнаружена мутация V617F в данном гене.

9.2 Материалом для исследования служит образец ДНК, выделенный для анализа мутационного статуса вышеуказанного гена (п. 9.1).

10 ПОСТАНОВКА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ТИПА INDEL В ГЕНЕ *CALR*

10.1 Постановка ПЦР осуществляется партиями по 5 – 10 образцов, включая три контроля – два положительных и один отрицательный (контроль нормы).

10.2 Перед проведением ПЦР-анализа рассчитать объем каждого реактива для конкретной постановки по Формуле 1.

$$V = x \cdot (N + 3) \tag{1}$$

- где V – объем реактива;
 N – количество образцов;
 x – объем реактива для одного образца.

10.3 Приготовить общую реакционную смесь для постановки ПЦР с учетом количества исследуемых образцов в соответствии с Таблицей 1.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 7/14

Таблица 1 – Расход реактивов для постановки одного исследуемого образца ДНК

№ п/п	Наименование реактива	Объем реактива, мкл
1	10X буфер с KCL (с добавлением 25 мМ MgCl ₂), состав буфера будет указан в патенте на методику	5,0
2	Смесь нуклеозидтрифосфатов (dNTP), 10 мМ водный раствор (рН 7,0)*	0,5
3	Смесь праймеров, 10 мкМ	1,0
6	Hot Start Taq ДНК-полимераза, 1000 е.а.	0,5
7	Вода деионизованная для ПЦР	16,0

* Смесь dNTP представляет собой водный раствор четырех высокоочищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) с концентрацией каждого из них 10 мМ.

ВНИМАНИЕ! Все работы с ПЦР-реактивами необходимо проводить с использованием ледяной бани.

10.4 В ледяную баню поставить пробирки-аликвоты с рабочими растворами, указанными в Таблице 1, за исключением HS-Taq ДНК-полимеразы (далее – ДНК-полимераза), так как хранить ее необходимо при температуре не выше минус 16 °С. Дождаться их полного размораживания.

10.5 В пробирки типа «Эппендорф» объемом 0,6 мл последовательно добавить необходимое количество реактивов в соответствии с Таблицей 1, количество которых рассчитано по Формуле 1. Перед добавлением реактивы тщательно перемешать и осадить, используя центрифугу/вортекс.

10.6 После добавления всех реактивов к полученной смеси добавить ДНК-полимеразу. Реакционную смесь хорошо перемешать и осадить на центрифуге/вортексе.

10.7 Далее все манипуляции с образцами ДНК и контролями необходимо проводить в, так называемой, «грязной зоне», то есть в отдельном боксе с УФ-ламинарным шкафом.

10.8 Подготовить пробирки типа «Эппендорф» объемом 0,2 мл в количестве, равном количеству исследуемых образцов и с учетом трех контролей, промаркировать их: номер образца, «N» – отрицательный контроль (норма), «D» – первый положительный контроль, «I» – второй положительный контроль.

10.9 В каждую промаркированную пробирку добавить по 23 мкл реакционной смеси и по 2 мкл образца ДНК. В пробирки для отрицательного и положительных контролей добавить по 2 мкл соответствующей ДНК. Образцы перемешать и осадить на центрифуге/вортексе.

10.10 Поместить пробирки в ДНК-амплификатор и загрузить режим амплификации «CALR2M».

10.11 После проведения амплификации образцы продуктов ПЦР поместить в холодильник с температурным режимом от 2 до 8 °С для дальнейшей детекции.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 8/14

11 ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

11.1 Подготовить рабочее место, убедиться, что в помещении для постановки электрофореза есть все материалы, необходимые для работы.

ВНИМАНИЕ! Перед входом в помещение для постановки электрофореза необходимо сменить халат. Все работы проводить в перчатках, при этом отработанные (не продезинфицированные) перчатки из данного помещения выносить запрещено. При выходе из помещения необходимо сменить халат и тщательно вымыть руки с мылом.

11.2 Подготовить электрофоретические стекла, одно из которых имеет вырез (убедиться в том, что они сухие и чистые). Вставить между стеклами снейсеры, толщиной 1 мм, при этом нижний край стекла без выреза должен выступать на 2 – 3 мм относительно стекла с вырезом. Зафиксировать стекла в таком положении с помощью зажимов.

11.3 Приготовить 8 % полиакриламидный гель в соответствии с Таблицей 2.

Таблица 2 – Расход реактивов для приготовления полиакриламидного геля

Процентная концентрация геля	TBE-10x, мл	AA:ВАА*, мл	H ₂ O _д , мл	ПСА 10 %**, мкл	TEMED, мкл	Общий объем, мл
8% (19:1)	1,50	6,00	7,50	112,50	18,75	15,13

* AA:ВАА – акриламид-бис-акриламид, приготовленный согласно Приложению А к настоящему Документу.

** ПСА – 10% персульфат аммония, приготовленный согласно Приложению А к настоящему Документу;.

11.4 В стакан для приготовления геля последовательно добавить реактивы согласно Таблице 2. После добавления 10 % персульфата аммония (ПСА) и TEMED гель начинает быстро полимеризоваться, поэтому их нужно добавлять в последнюю очередь.

11.5 Полученный раствор тщательно перемешать и с помощью шприца залить в пространство между стеклами. Гель заливать горизонтально с нижнего края до выреза внутреннего стекла, осторожно вставить гребенку с узкими карманами (на 23 кармана) на глубину примерно 0,5 – 0,7 см. При заливке геля необходимо избегать образования пузырьков воздуха.

11.6 Ждать полимеризации геля около 5 минут. Затем аккуратно вынуть гребенку, промыть образовавшиеся карманы дистиллированной водой или 1x TBE-буфером, оставшуюся воду или буфер из карманов удалить при помощи шприца объемом 5 – 10 мл. Промыть под проточной водой гребенку и ополоснуть дистиллированной водой.

11.7 Собрать камеру для проведения вертикального электрофореза, состоящую из полистироловых рамки и поддона, а также стеклов с гелем. Для этого с одной стороны рамки аккуратно закрепить с помощью зажимов стекло с гелем (избегая отслаивания геля от стекла), при этом стекло с вырезом должно прилегать к рамке, а стекло без выреза должно образовывать ее внешнюю стенку. С другой стороны рамки поставить заглушку,

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 9/14

представляющую собой так называемое «холостое стекло», и также закрепить его с помощью зажимов.

ВНИМАНИЕ! При сборке камеры необходимо, чтобы нижние границы стекол были на одном уровне с основанием рамки.

11.8 Собранную верхнюю камеру, состоящую из рамки, стекл с гелем и «холостого стекла», установить в поддон.

11.9 Залить 1х ТВЕ-буфер в верхнюю часть камеры и поддон, при этом уровень буфера в верхней части камеры должен быть на 10 мм ниже верхней кромки рамки, а в поддоне – на 8 – 10 мм ниже верхней его кромки.

11.10 Убедившись, что буфер в камере не подтекает (в случае, если камера собрана неправильно), в карманы геля внести по 2,5 мкл образца продуктов амплификации, разбавленного буфером для нанесения на электрофорез в соотношении 5:1. В один из карманов, не являющийся крайним, добавить 0,8 мкл ДНК-маркера молекулярной массы (50bp DNA Ladder).

ВНИМАНИЕ! Пробы в карманы геля необходимо вносить плавно, чтобы образцы распределились ровным слоем по дну карманов, не допуская контаминирования соседних карманов вносимым образцом.

11.11 Закрыть камеру крышкой с разноцветными шнурами, строго соблюдая полярность камеры (красный шнур – к аноду, маркированному красным цветом, черный шнур – к катоду, маркированному черным цветом). Шнуры крышки также должны быть подключены к блоку питания «Эльф-4» с соблюдением полярности (красный шнур к красному разъему, черный – к черному).

11.12 Убедившись, что камера полностью собрана, включить блок питания «Эльф-4», задать необходимый режим (напряжение).

11.13 Электрофоретическое разделение продуктов амплификации контролировать по длине пробега ксилोलцианола (верхняя полоса красителя), который имеет меньшую электрофоретическую подвижность, чем бромфеноловый синий (нижняя полоса красителя).

11.14 После завершения электрофореза выключить ток, снять крышку с камеры, слить 1х ТВЕ-буфер, снять стекла с гелем и оставить их на 3-5 минут для охлаждения.

11.15 После охлаждения аккуратно, используя скальпель, извлечь спейсеры и снять стекло с вырезом, при этом гель должен остаться на прямоугольном стекле.

11.16 Поместить стекло с гелем в кювету для покраски, аккуратно залить его раствором бромистого этидия (далее – EtBr), не допуская образования пузырьков воздуха, закрыть крышкой или плотной фольгой и оставить на 3 – 5 минут для окрашивания геля.

ВНИМАНИЕ! EtBr является сильным мутагеном, канцерогеном и тератогеном, поэтому все работы с ним необходимо проводить с использованием химически стойких перчаток (например, неопреновых). Не допускается его попадание на одежду и открытые участки тела.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 10/14

11.17 По окончании времени окрашивания геля (5 – 10 минут) раствор EtBr из кюветы аккуратно слить обратно в бутылку для его хранения.

11.18 Окрашенный гель аккуратно перенести на поверхность трансиллюминатора, используя скальпель. С помощью гель-документирующей системы сфотографировать гель при экспозициях 200, 400 и 800.

11.19 По окончании работы стекла из-под геля хорошо промыть под проточной водой с использованием моющего средства, ополоснуть их дистиллированной водой, ополоснуть водой камеру, спейсеры, зажимы, кюветы для окрашивания геля. Рабочее место обработать с помощью ветоши, смоченной дезинфицирующим средством 0,2 % раствором ДП-2Т, обладающим способностью инактивировать ампликоны.

12 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

12.1 Утилизацию отходов проводить в соответствии с СОП-ОБО-25-005 «Порядок сбора и утилизации биологического материала и отходов в лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии и лаборатории цитогенетики».

13 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

13.1 Настоящий Документ разработан на основании следующих нормативных актов и документов:

- ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

- ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.

- ГОСТ 2.105-95. ЕСКД. Общие требования к текстовым документам.

- СОП-КЛД-25-005 «Порядок сбора и утилизации биологического материала и отходов в лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии и лаборатории цитогенетики».

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

14 ИСТОРИЯ ДОКУМЕНТА

Дата введения в действие	Версия	Описание обновления	Фамилия, инициалы разработчика
	1	Введено в действие впервые	Овсесян В.А. Трегубова Е.В.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций <i>indel</i> в гене <i>CALR</i>		С. 11/14

Приложение А

Способы приготовления используемых растворов

Таблица А1 – Приготовление 10х ТВЕ-буфера

№ п/п	Наименование реактива	Количество
1	Трис-НСI (1 М)	11 г
2	Борная кислота	5,5 г
3	ЭДТА (0,5 М, рН=8,0)	4 мл
4	Вода бидистиллированная	До 100 мл

1. Подготовить мерный стаканчик с крышкой на 100 мл, промаркировать его (наименование, концентрация, дата).
2. Навески трис-НСI и борной кислоты перенести в подготовленный мерный стаканчик и растворить в 50 мл бидистиллированной воды.
3. С помощью дозатора отобрать 4 мл готового раствора ЭДТА и перенести к растворенным навескам.
4. Довести объем полученного раствора до 100 мл.
5. Хранить в холодильнике при температуре от 4 до 6 °С (до выпадения осадка в растворе).

Таблица А2 – Приготовление 1х ТВЕ-буфера

№ п/п	Наименование реактива	Количество
1	Раствор 10х ТВЕ-буфера	100 мл
2	Вода бидистиллированная	До 900 мл

1. Подготовить специальную емкость с крышкой до 1000 мл, промаркировать ее (наименование, концентрация, дата).
2. Перелить готовый раствор 10х ТВЕ-буфера в подготовленную емкость.
3. Довести объем полученного раствора до 1000 мл.
4. Хранить при комнатной температуре (бессрочно).

Таблица А3 – Приготовление раствора акриламида-бис-акриламида в соотношении 19:1

№ п/п	Наименование реактива	Количество
1	Акриламид 2-перекристаллизованный (АА)	29 г
2	Метилен-бис-акриламид (БАА)	1 г
3	Вода бидистиллированная	100 мл

1. Подготовить мерный стаканчик с крышкой на 100 мл, промаркировать его (наименование, соотношение солей, дата).
2. Навески АА и БАА поместить в стакан, добавить 50 мл бидистиллированной воды. Поместить емкость на магнитную мешалку, ждать полного растворения солей.
3. Перелить раствор в подготовленный мерный стаканчик, довести объем до 100 мл.
4. Хранить в холодильнике при температуре не ниже 4 – 6 °С (бессрочно).

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-27-015	Версия 1
Скрининг мутаций indel в гене <i>CALR</i>		С. 12/14

Продолжение Приложения А

Таблица А4 – Приготовление 10 % раствора персульфата аммония

№ п/п	Наименование реактива	Количество
1	Соль аммония персульфат (ПСА)	0,5 г
2	Вода бидистиллированная	5,0 мл

1. Подготовить пробирку на 15 мл, промаркировать ее (наименование, дата).
2. Навеску ПСА растворить в 5 мл бидистиллированной воды. Хорошо перемешать, переворачивая пробирку 10 – 15 раз.
3. Хранить раствор в холодильнике при температуре не ниже 4 – 6 °С в течение месяца.

ВНИМАНИЕ! Соль ПСА в растворенном виде при действии солнечных лучей и при комнатной температуре быстро разрушается, поэтому раствор необходимо хранить в темном, прохладном месте (холодильнике).