

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИХБФМ СО РАН)

УДК 57(047.31)  
№ госрегистрации  
АААА-А17-117080410013-4  
Инв. № 9-2017

«УТВЕРЖДАЮ»  
директор ИХБФМ СО РАН  
член-корреспондент РАН  
доктор химических наук

\_\_\_\_\_ Д.В. Пышный

22.12.2017

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований  
государственных академий наук на 2013–2020 годы

VII. Физиология и фундаментальная медицина. 65. Применение интегративного подхода в анализе молекулярных процессов и их регуляции у живых существ на разных этапах эволюции и при адаптации организма человека и животных к меняющимся условиям среды обитания и экстремальным воздействиям; использование полученных результатов в клинической медицине, практике космических полетов и медицине экстремальных состояний

ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ И РАЗВИТИЕ КОЛЛЕКЦИИ БИОМАТЕРИАЛА  
(ДНК, РНК И ПЛАЗМА) ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ МУЛЬТИФАКТОРНЫМИ  
СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ  
(заключительный)

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0309-2017-0009

Протокол Ученого совета  
№ 13 от 22.12.2017

Научный руководитель  
канд. биол. наук

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

М.Л. Филипенко

Новосибирск – 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, Зав. лаб., канд. биол. наук	_____	М.Л. Филипенко
	подпись, дата	
Исполнители темы м. н. с., канд. биол. наук	_____	Е.А. Соколова
	подпись, дата	
н. с., канд. биол. наук	_____	Е.Н. Воронина
	подпись, дата	
м. н. с., канд. биол. наук	_____	М.А. Дымова
	подпись, дата	
м. н. с., канд. биол. наук	_____	А.С. Шадрина
	подпись, дата	
м. н. с., канд. биол. наук	_____	У.А. Боярских
	подпись, дата	
м. н. с.	_____	И.П. Оскорбин
	подпись, дата	
м. н. с.	_____	А.А. Кечин
	подпись, дата	
м. н. с.	_____	Е.А. Храпов
	подпись, дата	
м. н. с.	_____	О.В. Мишукова
	подпись, дата	
Инженер 1 категории	_____	И.В. Хлистун
	подпись, дата	
ст. лаборант	_____	А.Н. Ширшова
	подпись, дата	
ст. лаборант	_____	Д.В. Шамовская
	подпись, дата	
ст. лаборант	_____	З.А. Пашкова
	подпись, дата	
нормоконтролер	_____	Е.А. Соколова
	подпись, дата	

## РЕФЕРАТ

Отчет 82 с., 1 ч., 3 рис., 2 табл., 6 источников, 8 прил.

### МУЛЬТИФАКТОРНЫЕ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, КОЛЛЕКЦИЯ ДНК, КОЛЛЕКЦИЯ РНК, КОЛЛЕКЦИЯ ПЛАЗМЫ, ФАРМАКОГЕНОМИКА, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РАЗЛИЧИЙ В ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

Объект исследования – биоресурсная коллекция «Коллекция биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями».

Цель работы – поддержание биоресурсной коллекции «Коллекция биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями».

Результаты. В рамках выполнения государственного задания были проведены следующие работы:

- 1) Создан технологический паспорт «Коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями» (КБМЗ) ИХБФМ СО РАН, включающий в себя: (а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; (б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН.
- 2) Технологический паспорт КБМЗ ИХБФМ СО РАН размещен на интернет-сайте коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН.
- 3) Проведена экспериментальная верификация трех СОПов;
- 4) Результаты верификации СОПов записаны в электронной базе КБМЗ ИХБФМ СО РАН;
- 5) Пополнен электронный каталог коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН информацией о 2 выборках согласно формата унифицированного описания образцов материала из КБМЗ ИХБФМ СО РАН.
- 6) Подготовлены две рукописи статей в рецензируемых журналах на основе материалов коллекции, обе опубликованы (Scopus).
- 7) Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.
- 8) Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

Прогнозные предположения о развитии объекта исследования: в дальнейшем планируются работы по поддержанию коллекции, расширению фондов и оказание услуг по запросам.

## СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ .....	9
1 Общая информация о коллекции .....	9
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного госзадания .....	10
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование .	10
4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания ..	11
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	25
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	26
Приложение А. Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы.....	27
Приложение Б. Стандартная операционная процедура «Идентификация и характеристика биоматериала пациентов».....	29
Приложение В. Стандартная операционная процедура «Выделение ДНК из биоматериала пациентов» .....	36
Приложение Г. Стандартная операционная процедура «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов».....	45
Приложение Д. Стандартная операционная процедура «Контроль качества образцов биоматериала».....	52
Приложение Е. Стандартная операционная процедура «Выделение РНК из биоматериала пациентов» .....	61
Приложение Ж. Стандартная операционная процедура «Выделение циркулирующей ДНК из плазмы» .....	68
Приложение И. Календарный план работ .....	82

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АВМ – артериовенозные мальформации

ВБВНК – варикозная болезнь вен нижних конечностей

ИХБФМ СО РАН - Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук

КБМЗ - коллекция биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих  
мультифакторными социально-значимыми заболеваниями

МЗ – мультифакторное заболевание

РОНЦ – Российский онкологический научный центр

ФАНО – Федеральное агентство научных организаций

ФБ – федеральный бюджет

ЦКП – центр коллективного пользования

С.І. – confidence interval, доверительный интервал

OR – odds ratios, отношение шансов

SNP – single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время условно выделяют моногенные (менделирующие) наследственные заболевания, для которых детерминирующим фактором являются нарушения в одном гене, с определяющим вкладом дефектов продукта этого гена в развитие заболевания, и полигенные (мультифакторные, комплексные) заболевания, в этиологии которых важную роль играет взаимодействие внешних факторов и особенностей структуры большого количества генов, каждый из которых вносит незначительный вклад в реализацию заболевания. Существует две гипотезы, объясняющие генетическую природу предрасположенности к мультифакторным заболеваниям (МЗ).

Одна из них основывается на общепринятой теории, впервые сформулированной Эриком Ландером: «частым заболеваниям соответствуют и частые полиморфизмы» [1]. Согласно этой теории, большая часть межиндивидуальных различий в геноме обусловлена давно возникшими, закрепившимися в популяции полиморфными вариантами, которые и отвечают за наследственную предрасположенность к МЗ. Следовательно, генетическая предрасположенность к МЗ заболеваниям формируется как результат суммарного действия небольших эффектов большого количества генов, продукты которых взаимодействуют с внешними факторами риска.

В последнее время популярность завоевывает гипотеза о значимой роли редких, недавно возникших, высокопенетрантных мутаций функционально значимых генов в наследственной предрасположенности к МЗ [2], в том числе и к РС. Обе эти гипотезы не являются взаимоисключающими и, возможно, что они обе, но в разной степени, описывают распространенные МЗ.

Знание генетических факторов риска позволит сформировать полный молекулярный механизм патогенеза мультифакторного заболевания. Знание этиологии МЗ увеличит шансы создания таргетной терапии, которая не только облегчит симптоматику, но и сможет корректировать течение заболевания на молекулярном уровне, точно воздействуя на «причинные» звенья патогенеза

Задача выявления факторов риска развития МЗ, к числу которых относятся и генетические факторы, может быть решена в рамках эпидемиологических исследований. Такие исследования требуют формирования группы пациентов с верифицированным диагнозом и группы здоровых индивидуумов. Учитывая, что каждый ген вносит небольшой эффект, то для получения статистически значимых результатов с уровнем мощности не менее 80% необходимо формировать выборки большого размера (например, для большинства полиморфных локусов, предрасполагающих к развитию сахарного диабета 2 типа требуются выборки размером не менее 10 000 пациентов и 10 000 условно здоровых

людей). Зачастую сформировать подобные выборки в рамках одного медицинского учреждения не представляется возможным. Более того, выявленные ассоциации требуют верификации на выборках других популяций. Подобные задачи могут быть решены только в рамках мультицентровых исследований, а также посредством международных коллабораций.

В связи с изложенными выше соображениями актуально создание коллекций биоматериала пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями. Основным назначением таких коллекций является формирование, сохранение и обеспечение доступного коллекционного фонда биоматериалов (ДНК, РНК, плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями, для использования в исследованиях молекулярных механизмов развития заболеваний; исследования молекулярных основ различий в эффективности терапии. Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК, плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН (КБМЗ ИХБФМ СО РАН) является одной из крупнейших коллекций биоматериала, на базе коллекции проводятся исследовательские работы по изучению молекулярных механизмов патогенеза и эффективности терапии широким кругом пользователей: сотрудниками лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН, студентами и аспирантами НГУ, клиницистами в рамках написания диссертационных работ, а также в рамках выполнения научных проектов, и наконец, биоматериал коллекции участвовал в международных исследованиях в рамках консорциума по рассеянному склерозу.

Цель работы – поддержание и развитие коллекционного фонда и оказание услуг по работе с биоматериалом (ДНК, РНК, плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями.

Задачи:

Создать Технологический паспорт КБМЗ ИХБФМ СО РАН, который включает в себя: (а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; (б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

Разместить Технологический паспорт КБМЗ ИХБФМ СО РАН на интернет-сайте коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

Экспериментально верифицировать три СОПа: (а) СОП по идентификации и характеристике биоматериала пациентов (на 1000 образцах ДНК, образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах плазмы человека); (б) СОП «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов» (на 500 образцах ДНК, образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах

плазмы человека); (в) СОП «Контроля качества образцов биоматериала» (на 500 образцах ДНК, образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах плазмы человека).

Записать результаты верификации СОПов в электронной базе КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

Пополнить электронный каталог коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН информацией о 2 выборках согласно формата унифицированного описания образцов материала из КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

Подготовить две рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), на основе материалов коллекции.

Подготовить календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

Разместить отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

В целом, поставленные цели и задачи дают необходимую базу для функционирования коллекции биоматериала человека.

Настоящий отчет является заключительным по теме «Инвентаризация и развитие коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями» за 2017 год.



## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции: Коллекция биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями (КБМЗ ИХБФМ СО РАН)

1.2 Наименование организации ФАНО России – держателя коллекции (если организация прошла реорганизацию в 2017г, то указать старое и новое название): Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 309

1.4 Направление ФНИ: VII. Физиология и фундаментальная медицина. 65. Применение интегративного подхода в анализе молекулярных процессов и их регуляции у живых существ на разных этапах эволюции и при адаптации организма человека и животных к меняющимся условиям среды обитания и экстремальным воздействиям; использование полученных результатов в клинической медицине, практике космических полетов и медицине экстремальных состояний.

1.5 Руководитель коллекции, поддерживающий коллекцию: Филипенко Максим Леонидович, зав. лабораторией, кандидат биологических наук, max@niboch.nsc.ru, (383) 363-51-70

1.6 Назначение коллекции: формирование, сохранение и обеспечение доступного коллекционного фонда биоматериалов (ДНК, РНК, плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями, для использования в исследованиях молекулярных механизмов развития заболеваний; исследования молекулярных основ различий в эффективности терапии.

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП/УНУ «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации»: Есть.

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП/УНУ на сайте <http://www.ckp-rf.ru>: Центр коллективного пользования «Коллекция биоматериалов (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями», реестровый номер 505827, <http://ckp-rf.ru/ckp/505827/>

1.9 Дата образования коллекции: 25.01.2017.

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: *Нет*

1.11 Положение о коллекции, утвержденное на Ученом совете организации - Положение о коллекции утверждено на Ученом совете организации (протокол №1 заседания Ученого совета ФГБУН ИХБФМ СО РАН от 15.02.2017)

1.12 Адрес WEB-сайта организации, на котором представлена информация о коллекции: <http://www.mdbiobank.niboch.nsc.ru>

2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного госзадания

2.1 Текст Отчета представлен на:

а) WEB-сайте организации: <http://www.mdbiobank.niboch.nsc.ru>

б) Информационном портале БРК: <http://brk.forge.sccc.ru/kollekcii/kollekcii-biomaterialov-cheloveka/kollekciya-biomaterialov-dnk-rnk-i-plazma-pacientov>

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН: Создан Технологический паспорт коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями, (КБМЗ ИХБФМ СО РАН). Экспериментально верифицированы стандартные операционные процедуры, обеспечивающие развитие и поддержание коллекционного фонда. Создан формат унифицированного описания образцов материала из коллекции ИХБФМ СО РАН в компьютерной базе биоматериалов человека. Проведена первичная инвентаризация материалов из коллекции ИХБФМ СО РАН. Приняты в печать в рецензируемые журналы (Scopus, WoS) две публикации, подготовленные по итогам выполнения дополнительного госзадания (Приложение А).

3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0309-2017-0009

3.2 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе ЦИТИС АААА-А17-117080410013-4

3.3 Отчет по дополнительному госзаданию 0324-2017-0002 подготовлен и загружен в систему Парус 29.01.2018.

3.4 Отчет по дополнительному госзаданию (АААА-А17-117080410013-4) подготовлен и загружен в систему ЦИТИС 29.01.2018.

3.5 Объем финансирования по Дополнительному соглашению к Соглашению о предоставлении субсидии из ФБ на финансовое обеспечение выполнения государственного

задания, на оказание государственных услуг (выполнение работ) от 08 ноября 2017 г. (внутренний номер 007-ГЗ/Ц2559/309/2) составил 2 499 950 руб.

3.6 Субсидии на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 г ИХБФМ СО РАН не получал.

4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

4.1 Подготовка технологического паспорта «Коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН»

Технологический паспорт КБМЗ ИХБФМ СО РАН включает в себя: а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН. Технологический паспорт размещен на интернет-сайте коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН (<http://www.mdbiobank.niboch.nsc.ru>).

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 образцов ДНК, 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;
- колоректальный рак.

В рамках выполнения дополнительного государственного задания был описан комплекс стандартных операционных процедур, необходимых как для поддержания уже существующего фонда коллекции, так и для развития коллекции путем пополнения новыми

образцами. Данный комплекс включает в себя шесть СОП и входит в Технологический паспорт КБМЗ ИХБФМ СО РАН. СОПы находятся в Приложениях Б–Ж, ниже приведены их названия:

- Идентификация и характеристика биоматериала пациентов (Приложение Б);
- Выделение ДНК из биоматериала пациентов (Приложение В);
- Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов (Приложение Г);
- Контроль качества образцов биоматериала (Приложение Д);
- Выделение РНК из биоматериала пациентов (Приложение Е);
- Выделение циркулирующей ДНК из плазмы (Приложение Ж).

Описание СОП доступно на сайте коллекции биоматериала в разделе «Технологический паспорт коллекции» (<http://www.mdbiobank.niboch.nsc.ru>).

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих развитие и поддержание Коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН, были собраны данные об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ по перечисленным ниже направлениям деятельности коллекции:

- 1) Выполнение стандартных операционных процедур (СОП).
- 2) Выполнение научно-исследовательских работ.
- 3) Общее содержание коллекции.

Собранные данные были использованы для расчета стоимости выполнения 6 СОП, величины накладных расходов на содержание коллекции и необходимого годового объема финансирования. Обобщенный пример расчета стоимости СОП приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Расчет стоимости СОП «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов»

№, п/п	Статья расходов	Сумма, руб.
1	Оплата труда	118,59
2	Приобретение материалов	271,55
3	Иные затраты	-
4	Содержание оборудования	5,06
	Итого:	395,2

Расчеты проводились в соответствии моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций» ([http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_finance/report](http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/report)). Полный набор данных представлен на портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России» ([http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_finance/collections/65](http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/collections/65)).

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ и составил 12 035 953,09 руб., из которых 11 550 776,02 руб. запланированы для выполнения работ по содержанию и развитию коллекции, 485 117,07 руб. запланированы для обеспечения накладных расходов на работу коллекции.

4.2 Подготовлена документация по технологическому паспорту коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН и размещена на интернет-сайте коллекции в разделе «Технологический паспорт коллекции»: (<http://www.mdbiobank.niboch.nsc.ru>).

4.3 Идентифицирован и охарактеризован вновь поступивший биоматериал пациентов в количестве 1000 образцов ДНК, 300 образцов плазмы.

Вновь поступивший биоматериал пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями для последующего депонирования в коллекции выделенной из него ДНК поступал в рамках двух проектов:

- В рамках совместной работы по исследованию генетической предрасположенности к сахарному диабету и эффективности гипогликемической терапии, проводимой совместно с ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России и ГБУЗ НСО Государственная Новосибирская областная клиническая больница, в коллекцию биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН, было передано 700 образцов венозной крови от пациентов с сахарным диабетом для депонирования в коллекции.

- В рамках совместной работы с ГБУЗ НСО Государственная Новосибирская областная клиническая больница по исследованию влияния генетических детерминант на анти-VEGF терапию (Raminizumab) у пациентов с разными формами ретинопатии: диабетический макулярный отек, возрастная макулярная дегенерация и др. Всего было передано 300 образцов венозной крови от пациентов для депонирования в коллекции.

- В рамках совместной работы с Российским онкологическим научным центром (РОНЦ) им. Н.Н. Блохина (г. Москва), Алтайским филиалом ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Барнаул) и ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер» по исследованию профиля внеклеточной ДНК в коллекцию биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН, было передано 300 образцов плазмы от пациентов с колоректальным раком.

Биоматериал представлял собой:

- 5 мл венозной крови, собранной в вакутейнер. Каждый вакутейнер имел уникальную кодировку;

- образец замороженной плазмы крови в индивидуальной пробирке типа Eppendorf 1,5 мл или пробирке 15 мл.

Одновременно с образцами в ЦКП КБМЗ ИХБФМ СО РАН были переданы документы, включающие полное клиническое описание образцов и соответствие описания пациента уникальной кодировке на вакутейнере с венозной кровью.

Оператором ЦКП КБМЗ ИХБФМ СО РАН согласно СОП «Идентификация и характеристика биоматериала пациентов» (Приложение Б) были проведены подготовительные работы, необходимые для соблюдения инструкций по технике безопасности и инструкций по биобезопасности:

Подготовка персонала к проведению работ

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

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;

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.

После проведения подготовительных работ оператором согласно СОП «Идентификация и характеристика биоматериала пациентов» была проведена проверка выполнения условий доставки биоматериала с дальнейшей идентификацией и характеристикой полученного биоматериала.

Контроль качества. Оператор проверил, что образцы биоматериала пациента, подлежащего депонированию в КБМЗ ИХБФМ СО РАН, должны быть заморожены, пронумерованы согласно сопроводительной документации.

По завершении 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 вводил в базу данных код образцов, отправителя, всю сопроводительную информацию. Если образцы содержали персональную информацию, оператор проверял наличие в сопроводительной документации информированного соглашения от пациента на участие в исследовании, затем вносил в базу 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 оператор осуществлял автоматическое внесение образца в базу данных КБМЗ ИХБФМ СО РАН. В случае отсутствия штрих-кода оператор вводил самостоятельно номер образца в учетную документацию.

В случае неполного предоставления данных о больном, от которого был получен образец крови, в соответствующую региональную лабораторию оператор направлял запрос на недостающие сведения.

Дополнительно коллекция биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН была пополнена образцами ДНК из 40 линий соматических клеток человека банка лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН. Идентификация и охарактеризация образцов клеточных линий включали проверку кода линии на ампуле с алиquotой и наличия полного описания клеточной линии в базе банка клеточных линий лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН. По завершении процедуры образцы клеточных линий культивировали для наработки необходимого количества клеток для выделения ДНК.

4.4 СОП «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов» - устанавливает порядок хранения биоматериала (ДНК, РНК, плазма, кровь, иной биоматериал) пациентов, депонированных в КБМЗ ИХБФМ СО РАН. Хранение – содержание биоматериала (ДНК, РНК, плазма, кровь, иной биоматериал) при контролируемых условиях, целесообразных требованиям, предъявляемым к биоматериалу, перед его исследованием или иной формой обращения. Экспериментальная верификация СОП проведена на 500 образцах ДНК,

образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах плазмы человека.

Данная СОП была верифицирована на 500 образцах ДНК и на образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах плазмы человека.

Из вновь поступивших образцов венозной крови, а также клеточных линий банка лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН, идентифицированных и охарактеризованных согласно СОП «Идентификация и характеристика биоматериала пациентов», была выделена геномная ДНК согласно протоколу СОП «Выделение ДНК из биоматериала пациентов» (Приложение В). После выделения производится размещение образцов ДНК на хранение:

- образцы ДНК вне зависимости от способа выделения и способа стабилизации хранят при температуре  $-20...-60$  °С, 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.

При необходимости аликвотирования образца ДНК для размещения на хранение или в процессе его хранения, выполняется процедура аликвотирования 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 информацию следующие данные: дата разаликвотирования, ФИО исполнителя, объем перенесенного образца и количество аликвот, цель разаликвотирования, место хранения аликвот.

Хранение 300 вновь поступивших образцов плазмы от пациентов с колоректальным раком проводили согласно процедуре «Размещение плазмы для хранения» СОП «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов»:

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

- не допускается аликвотирование образцов плазмы. Аликвотирование выполняют одновременно с исследованием.



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

Перед размещением образцов на хранение и по завершении оператор выполнял все необходимые процедуры по соблюдению инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности, описанные в разделах подготовительный и завершающий этап СОП «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов».

4.5 Проведен контроль качества образцов биоматериала пациентов, депонированного в коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН. Суммарно контроль качества был выполнен на 500 образцах ДНК, образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах плазмы человека. Все процедуры были выполнены в строгом соответствии с СОП «Контроль качества образцов биоматериала» (Приложение Д). Данная методика устанавливает порядок контроля качества образцов биоматериала пациентов (ДНК, РНК и плазма), депонированных в КБМЗ ИХБФМ СО РАН. 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.

В начале процедуры оператор визуально определял сохранность надписи с кодом образца биоматериала на пробирке. В случае деформации надписи или закрывающего ее скотча оператор был обязан перенести образец в новую пробирку, указать на ней код образца маркером, заклеить надпись клейкой лентой. Если надпись нечитаемая, то оператор обязан утилизировать образец. По результатам проверки у всех образцов (500 образцов ДНК, 40 образцов нуклеиновых кислот из линий соматических клеток человека и 300 образцов плазмы человека) код образца был сохранен.

Вторым этапом проверки 500 образцов ДНК, 40 образцов нуклеиновых кислот из линий соматических клеток человека была оценка количества биоматериала (ДНК) в образце. Оценку количества ДНК в образце оператор проводил спектрофотометрическим методом:

- каждый образец ДНК предварительно разморозил в термостате;
- включил прибор NanoDrop™ Lite Spectrophotometer;
- выбрал программу «dsDNA»;

– провел считывание «фона»: а) промыл датчик прибора нанесением 3 мкл дистиллированной воды, затем промокнул насухо фильтровальной бумагой, б) нанес 2 мкл дистиллированной воды на датчик прибора, провел измерение Blank, затем промокнул насухо фильтровальной бумагой, в) еще раз нанес 2 мкл дистиллированной воды на датчик прибора, провел второе измерение Blank, затем промокнул насухо фильтровальной бумагой, г) если считывание «фона» прошло успешно, то прибор выводил на дисплей сообщение «Blank confirmed», д) если считывание «фона» не выполнено, то оператор повторял пункты а)-в) еще раз.

– оператор нанес на датчик 2 мкл образца ДНК, провел измерение, зафиксировал письменно величины: коэффициент A260/280, концентрацию ДНК в нг/мкл (Таблица 1);

– промыл датчик нанесением 2 мкл дистиллированной воды, затем промокнул насухо фильтровальной бумагой;

– повторил измерение. Нанес на датчик 2 мкл образца ДНК, провел измерение, зафиксировал письменно величины: коэффициент A260/280, концентрацию ДНК в нг/мкл (таблица 2);

– промыл датчик нанесением 2 мкл дистиллированной воды, затем промокнул насухо фильтровальной бумагой;

– выключил прибор;

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

Таблица 2 – Запись результатов контроля качества образца ДНК (приведена часть таблицы)

Код образца	Первое измерение		Второе измерение	
	коэффициент A260/280	концентрация ДНК, нг/мкл	коэффициент A260/280	концентрация ДНК, нг/мкл
PD0126	1.86	431.2	1.87	430.1
PD0152	1.85	324.0	1.88	325.2
PD0225	1.87	208.6	1.88	205.4
PD0226	1.88	118.4	1.87	121.3
PD0227	1.87	620.0	1.88	625.4
PD0228	1.88	104.3	1.88	108.2
PD0230	1.87	214.4	1.88	215.4
PD0232	1.87	262.7	1.87	265.1
PD0236	1.86	267.6	1.88	260.0

PD0255	1.85	196.2	1.86	198.7
PD0256	1.86	729.9	1.88	725.4
PD0260	1.87	1026.4	1.88	1025.4
PD0261	1.87	1398.5	1.86	1393.2
PD0262	1.86	991.9	1.88	995.4
PD0263	1.85	1237.2	1.87	1232.8
PD0264	1.86	420.4	1.87	425.1

Процедуру определения чистоты и размера молекул ДНК в образце методом агарозного гель-электрофореза оператор проводил в строгом соответствии с СОП:

- образец ДНК предварительно разморозил в термостате;
- залил агарозный гель;
- внес в каждую лунку 1%-ного агарозного геля по 1 мкл образца ДНК. В отдельные карманы внес маркер молекулярных масс в каждом ряду дорожек;
- подключил камеру к источнику постоянного электрического тока. Выставил параметры источника. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляла 6-10 В/см;
- выключил источник тока после завершения электрофореза, отсоединил провода от источника тока, перенес гель на трансиллюминатор геледокументирующего устройства;
- задокументировал полученную картину распределения длин ДНК в агарозном геле после проведения электрофореза при помощи трансиллюминатора (рисунок 1);
- после определения чистоты и размера молекул ДНК в образце методом агарозного гель-электрофореза вернул образец ДНК в место хранения до непосредственного начала исследования.

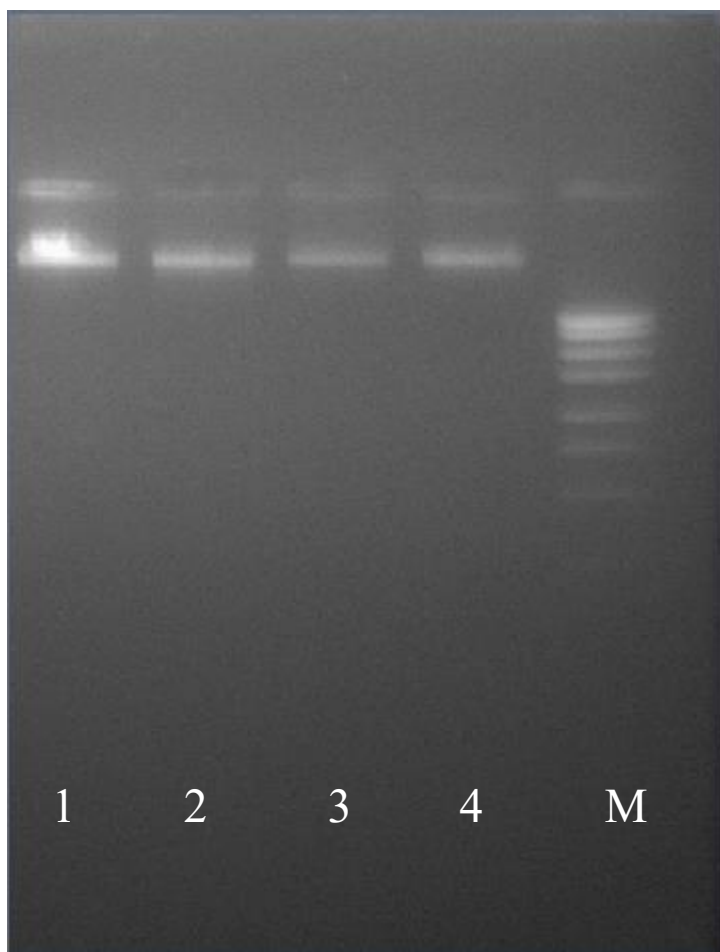


Рисунок 1 – Электрофореграмма распределения длин ДНК в агарозном геле. 1 - 4 образцы ДНК, М – маркер длин.

4.6 Произведена запись результатов верификации СОПов в электронной базе коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

Все образцы, задепонированные в коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН, имеют клиническое описание в электронной базе формата SQL. Электронная база содержит раздел «СОП Контроль качества», в котором отображается код образца, прошедший проверку, дата проведения СОП, наличие образца в коллекции, концентрация образца в нг/мкл (рисунок 2). В электронную базу коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН внесены данные, полученные при верификации СОПов.

Number	Дата проведения СОП	Наличие	Концентрация
PD0001	08/2017	есть	170
PD0002	08/2017	есть	75
PD0003	08/2017	есть	98
PD0004	08/2017	есть	230
PD0005	08/2017	есть	107
PD0006	08/2017	есть	241
PD0007	08/2017	есть	182
PD0008	08/2017	есть	224
PD0009	08/2017	есть	179
PD0010	08/2017	есть	131
PD0011	08/2017	есть	55
PD0012	08/2017	есть	105
PD0013	08/2017	есть	91
PD0014	08/2017	есть	136
PD0015	08/2017	есть	128
PD0016	08/2017	есть	87
PD0017	08/2017	есть	196
PD0018	08/2017	есть	116
PD0019	08/2017	есть	131
PD0020	08/2017	есть	148
PD0021	08/2017	есть	197
PD0022	08/2017	есть	225
PD0023	08/2017	есть	106
PD0024	08/2017	есть	151

Рисунок 2 – Пример записи результатов верификации СОП «Контроль качества образцов биоматериала».

4.7 Пополнен электронный каталог коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН информацией об образцах для трех выборок (Болезнь Паркинсона, Сахарный диабет, Ретинопатия) согласно формата унифицированной сетевой коллекции клеточных культур.

Для хранения информации об образцах, задепонированных в коллекции, был разработан формат унифицированного описания образцов материала из КБМЗ ИХБФМ СО РАН в компьютерной базе биоматериалов человека. Компьютерная база представляет собой электронную базу формата SQL. Для каждой нозологии (мультифакторной болезни) создана отдельная база. На рисунке 3 изображен интерфейс электронной базы «Болезнь Паркинсона».

Number	Doctor	OutNumber	FIO	YearOfStu	YearOfBi	Gende	Natic	Nationa	NationalityM	Рост	Вес	Хроническ	Семейный	Вosp
PD0135	Вострикова NSPNC25		Цицерман Милина Иван	13.02.2017	1952	ж	рус	рус	рус	158	73 нет		не знает	65
PD0136	Вострикова NSPNC32		Мишина Светлана Яковл	14.02.2017	1937	ж	рус	рус	рус	155	67 хр. Гастрит		не помнит	80
PD0137	Вострикова NSPNC33		Зиновьева Нина Иванов	15.02.2017	1952	ж	рус	рус	рус	165	75 ибс, стенокар	мать-серд не		64
PD0138	Вострикова NSPNC29		Ковалева Александра Ем	14.02.2017	1948	ж	рус	рус	рус	170	86 нет	мать-диссом		69
PD0139	Вострикова NSPNC31		Вольф Нина Адамовна	14.02.2017	1951	ж	рус	рус	рус	160	58 панкреатит,	мать-хр.гастр		66
PD0140	Вострикова NSPNC26		Омарова Наталья Никола	13.02.2017	1956	ж	рус	рус	рус	158	52 нет		не знает	61
PD0141	Вострикова NSPNC30		Якутина Татьяна Борисо	14.02.2017	1947	ж	рус	рус	рус	162	80 хр. Холестисти	мать-ибс, отс		70
PD0142	Вострикова NSPNC27		Кутовская Нина Василье	13.02.2017	1945	ж	рус	рус	рус	172	72 артериальна	мать-артери		72
PD0143	Вострикова NSPNC28		Ковалев Михаил Тимофе	14.02.2017	1942	м	рус	рус	рус	175	98 ибс, АГ, экстр	не знает		74
PD0144	Вострикова NSPNC01		Звягинцева Светлана Фе	2017	1950	ж	рус	рус	рус	152	68 мочекаменная	ОНМК мать		66
PD0145	Вострикова NSPNC02		Башканова Ольга Павло	2017	1930	ж	рус	рус	рус	159	64 нет	отец-погиб,		86
PD0146	Вострикова NSPNC03		Стволова Галина Игнать	2017	1952	ж	рус	рус	рус	165	70 артрит	мать-артрит		65
PD0147	Вострикова NSPNC04		Куркина Валентина Ива	30.01.2017	1951	ж	рус	рус	рус	158	63 нет		не помнит	66
PD0148	Вострикова NSPNC05		Наунов Андрей Владим	02.02.2017	1965	м	рус	рус	рус	170	68 нет		не помнит	52
PD0149	Вострикова NSPNC06		Захаргина Зоя Кузьмин	02.02.2017	1944	ж	рус	рус	рус	165	64 диффузно узл	мать-депресс		73
PD0150	Вострикова NSPNC07		Шенин Сергей Владимиро	02.02.2017	1955	м	рус	рус	рус	164	83 нет		БП, пламени,	о 61
PD0151	Вострикова NSPNC08		Леонова Ольга Владим	02.02.2017	1960	ж	рус	рус	рус	176	107 хр. Холестисти	СД		56
PD0152	Вострикова NSPNC09		Яковлев Юрий Александр	02.02.2017	1951	м	рус	рус	рус	176	76 нет		отец-БП мать	65

Рисунок 3 – Электронный каталог коллекции «Болезнь Паркинсона» КБМЗ ИХБФМ СО РАН.

Электронный каталог в обязательном порядке включает:

- основную информацию об образце (вкладка Person)
- контактные данные врачей, курирующих забор биоматериала пациентов (вкладка Контактные данные врачей)
- информацию о результатах СОП «Контроль качества» (вкладка СОП Контроль качества)
- информацию о проведенных исследованиях на образцах биоматериала (на примере электронного каталога «Болезнь Паркинсона» вкладки Gene и Person-Gene)

В зависимости от нозологии электронный каталог может содержать дополнительные вкладки, содержащие информацию об образцах биоматериала.

В рамках выполнения государственного задания были проведено депонирование образцов ДНК следующих мультифакторных заболеваний:

- сахарный диабет (987 образцов);
- болезнь Паркинсона (480 образцов);
- ретинопатия (309 образцов).

Клиническая характеристика задепонированных образцов, а также вся сопутствующая информация, внесена в электронный каталог КБМЗ ИХБФМ СО РАН согласно формата унифицированной сетевой коллекции клеточных культур.

4.8 На основе биоматериалов коллекции пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями были проведены два исследования, результаты которых опубликованы в журналах Scopus (Приложение А).

А) Исследование ассоциации полиморфизмов гена *ANGPTL4* с риском развития артериовенозных мальформаций (АВМ).

Артериовенозные мальформации – образованы гипертрофированными артериальными сосудами (афферентами, фидерами), большим количеством артериовенозных

шунтов, клубок которых образует тело (nidus) мальформации, и расширенных дренирующих вен. Целью этого исследования была репликация ассоциации однонуклеотидного полиморфизма (SNP) rs11672433 с развитием АВМ [3, 4] с последующим метаанализом опубликованных данных. В настоящее исследование было включено 252 российских пациента с АВМ мозга и 480 контрольных пациентов. Генотипирование проводили с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени с конкурентными гидролизными зондами. В нашем исследовании мы не обнаружили статистически значимой ассоциации АВМ и SNP rs11672433 гена *ANGPTL4* (OR= 0.82, 95% C.I. = 0.57-1,17 P = 0,27). Метаанализ также не подтвердил ранее полученную ассоциацию (OR = 1,18, 95% C.I. = 0.81-1,73, P = 0,39). Таким образом, несмотря на то, что *ANGPTL4* (белок) участвует в процессах регуляции ангиогенеза, мы считаем, что SNP rs11672433, высокочастотный полиморфный локус в гене *ANGPTL4*, не влияет на предрасположенность к АВМ или его эффект слишком мал, чтобы быть обнаруженным в наборе образцов настоящего размера.

Результаты опубликованы в журнале, входящем в базу данных Scopus, – *The Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases*. Выходные данные публикации:

Erkinova S.A., Sokolova E.A., Orlov K.Y., Kiselev V.S., Strelnikov N.V., Dubovoy A.V., Voronina E.N., Filipenko M.L. Angiopoietin-like proteins 4 (ANGPTL4) gene polymorphisms and risk of brain arteriovenous malformation. // *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017 Dec 5. pii: S1052-3057(17)30595-5. DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.033

Б) Исследование ассоциации полиморфизмов генов воспалительного пути с риском возникновения варикозной болезни вен нижних конечностей.

Ранее было показана, ассоциация ряда полиморфных локусов генов воспалительного пути с варикозной болезнью вен нижних конечностей (ВБВНК). Однако оба исследования были выполнены на пациентах с первыми стадиями заболевания [5, 6]. Поэтому роль воспаления в развитии трансформации стенки вены остается неубедительной. Целью нашего исследования было оценить влияние 13 связанных с воспалением SNPs: *TNF* rs1800629 и rs3093661, *IL1A* rs1800587, *IL1RN* rs4251961, *IL6* rs1800795 и rs1800796, *IFNG* rs2430561, *IL10* rs1800896, *TGFBI* rs1800469, *HIF1A* rs11549465, *NFKB1* rs28362491 и rs4648068 на возникновения варикозной болезни вен нижних конечностей у этнических русских. Мы генотипировали 709 пациентов с ВБВНК и 278 людей без истории хронического венозного заболевания и провели ассоциативный анализ с каждым SNP непосредственно и анализ гаплотипов. В нашем исследовании было выявлено несколько ассоциаций с  $P < 0,05$ : вариант аллеля *HIF1A* rs11549465 [T], *TNF* rs3093661 [A] и *NFKB1* rs28362491 [делеция АТТG] показали обратную связь с риском ВБВНК, а аллель *IL6* rs1800795 С был связан с повышенным риском изучаемой патологии. Анализ гаплотипов выявил ассоциации

гаплотипов *TNF* rs3093661 A-rs1800629 G и *IL6* rs1800795 C-rs1800796 G с уменьшенным и повышенным риском ВБВНК, соответственно. Однако все наблюдаемые ассоциации не смогли достичь статистической значимости после коррекции для множественного тестирования, которая была установлена на уровне  $10^{-3}$ . Поэтому наше исследование свидетельствует о том, что исследованные полиморфизмы не играют существенной роли в восприимчивости к ПВВ.

Результаты опубликованы в журнале, входящим в базу данных Scopus – *Immunologic research*. Выходные данные публикации:

Shadrina A.S., Voronina E.N., Smetanina M.A., Tsepilov Y.A., Sevost'ianova K.S., Shevela A.I., Seliverstov E.I., Zakharova E.A., Ilyukhin E.A., Kirienko A.I., Zolotukhin I.A., Filipenko M.L. Polymorphisms in inflammation-related genes and the risk of primary varicose veins in ethnic Russians. // *Immunologic research*. DOI : 10.1007/s12026-017-8981-4

Информация о публикациях размещена на интернет-сайте коллекции в разделе «Публикации» (<http://www.mdbiobank.niboch.nsc.ru>).

4.9 Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания (Приложение И).

4.10 Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями ИХБФМ СО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания: <http://www.mdbiobank.niboch.nsc.ru>.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках госзадания «Инвентаризация и развитие коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями» (Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0309-2017-0009) был создан Технологический паспорт коллекции биоматериала (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями, (КБМЗ ИХБФМ СО РАН). Экспериментально верифицированы стандартные операционные процедуры, обеспечивающие развитие и поддержание коллекционного фонда. Создан формат унифицированного описания образцов материала из коллекции ИХБФМ СО РАН в компьютерной базе биоматериалов человека. Проведена первичная инвентаризация материалов из коллекции ИХБФМ СО РАН. Приняты в печать в рецензируемые журналы (Scopus, WoS) две публикации, подготовленные по итогам выполнения дополнительного госзадания.

В ходе выполнения госзадания в срок и в полном объеме выполнены все поставленные задачи. Результаты, полученные в рамках госзадания, соответствуют поставленной цели – поддержание и развитие коллекционного фонда и оказание услуг по работе с биоматериалом (ДНК, РНК и плазма) пациентов, страдающих мультифакторными социально-значимыми заболеваниями.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Altshuler D., Daly M.J., Lander E.S. Genetic mapping in human disease. // *Science*. 2008. Vol. 322, № 5903. P. 881–888.
- 2 Yang Q. et al. How many genes underlie the occurrence of common complex diseases in the population? // *Int. J. Epidemiol.* 2005. Vol. 34, № 5. P. 1129–1137.
- 3 Mikhak B, Weinsheimer S, Pawlikowska L, Poon A, Kwok PY, Lawton MT, Chen Y, Zaroff JG, Sidney S, McCulloch CE, Young WL, Kim H. Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) gene polymorphisms and risk of brain arteriovenous malformations. // *Cerebrovasc Dis.* 2011;31(4):338-45. doi: 10.1159/000322601
- 4 Kremer PH, Koeleman BP, Rinkel GJ, Diekstra FP, van den Berg LH, Veldink JH, Klijn CJ. Susceptibility loci for sporadic brain arteriovenous malformation; a replication study and meta-analysis. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016 Jul;87(7):693-6. doi: 10.1136/jnnp-2014-310094.
- 5 Yasim A, Kilinc M, Aral M, Oksuz H, Kabalci M, Eroglu E, et al. Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins. *Phlebology.* 2008;23(1):15–20. doi: 10.1258/phleb.2007.007014.
- 6 Poredos P, Spirkoska A, Rucigaj T, Fareed J, Jezovnik MK. Do blood constituents in varicose veins differ from the systemic blood constituents? *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015;50(2):250–6. doi: 10.1016/j.ejvs.2015.04.031.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы

1 Erkinova S.A., Sokolova E.A., Orlov K.Y., Kiselev V.S., Strelnikov N.V., Dubovoy A.V., Voronina E.N., Filipenko M.L. Angiotensin-like proteins 4 (ANGPTL4) gene polymorphisms and risk of brain arteriovenous malformation. // *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017 Dec 5. pii: S1052-3057(17)30595-5. DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.033

2 Shadrina A.S., Voronina E.N., Smetanina M.A., Tsepilov Y.A., Sevost'ianova K.S., Shevela A.I., Seliverstov E.I., Zakharova E.A., Ilyukhin E.A., Kirienko A.I., Zolotukhin I.A., Filipenko M.L. Polymorphisms in inflammation-related genes and the risk of primary varicose veins in ethnic Russians. // *Immunologic research.* DOI : 10.1007/s12026-017-8981-4

#### ARTICLE IN PRESS

#### Angiotensin-Like Proteins 4 (ANGPTL4) Gene Polymorphisms and Risk of Brain Arteriovenous Malformation

Sarafroz A. Erkinova,\*†‡ Ekaterina A. Sokolova, PhD,\*† Kirill Y. Orlov, PhD,‡  
Vitaly S. Kiselev, PhD,§ Nikolay V. Strelnikov,‡ Andrey V. Dubovoy,§  
Elena N. Voronina, PhD,\*† and Maxim L. Filipenko, PhD\*†

**Background:** Brain arteriovenous malformations (BAVMs) are formed by hypertrophied arterial vessels (afferents, feeders), a large number of arteriovenous shunts which become tangled to form a body (nidus) of malformation, which then expands draining proximal veins. The aim of this study was a replication of single nucleotide polymorphism (SNP) rs11672433 association with BAVM development with the subsequent meta-analysis of published data. **Methods:** A total of 252 Russian patients with brain BAVMs and 480 control subjects were included in the present study. Genotyping was performed using real-time polymerase chain reaction with competitive hydrolysis probes. **Results:** In our case-control study, we found no significant association with brain arteriovenous malformation for the SNP rs11672433 of ANGPTL4 gene (odds ratio = 0.95, 95% confidence interval = 0.57-1.17,  $P$  value = .27) as well as in meta-analysis (odds ratio 1.18, 95% confidence interval = 0.81-1.73,  $P$  value = .39). **Conclusions:** Our data showed that SNP rs11672433 was not associated with the BAVM Russian population and the following meta-analysis did not detect an association in total. Thus, in spite of the fact that ANGPTL4 (protein) participates in the angiogenesis regulation processes, we consider that SNP rs11672433, a high-frequency locus in the ANGPTL4 gene, does not influence the predisposition to BAVM or its effect is too small to be detected in the present size sample set. **Key Words:** Arteriovenous malformations—angiotensin-like proteins 4 (ANGPTL4)—single nucleotide polymorphisms—association—gene.  
© 2017 National Stroke Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

From the \*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia; †Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia; ‡Novosibirsk Research Institute of Blood Circulation Pathology named after E. N. Medvedkin, Novosibirsk, Russia; and §Federal Neurological Center, Novosibirsk, Russia.

Received July 17, 2017; revision received October 18, 2017; accepted October 27, 2017.

Address correspondence to Sarafroz A. Erkinova and Maxim L. Filipenko, PhD, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia. E-mail: sarafroz@ngs.nsu.ru; maxfil@ibmc.nsc.ru

1052-3057/\$ - see front matter  
© 2017 National Stroke Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.  
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.033>

*Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, Vol. ■■, No. ■■, ■■, 2017; pp. ■■-■■

#### ARTICLE IN PRESS

6

S. A. ERKINOVA ET AL.

change the protein function. Also, according to the database Blood eQTL browser (<http://genetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>), single nucleotide polymorphism rs11672433 is annotated like expression quantitative trait locus (eQTL) for the MARCKR, ELAVL1 genes. So it would be unlikely that SNP rs11672433 has a direct functional effect on ANGPTL4.

There are few high-frequency SNPs in ANGPTL4 gene (MAF > .05). Practically all of them have been previously investigated and an association with BAVM was not detected, except for SNP rs11672433 in Mikhaik et al. study. The results of our study support no significant association of SNP rs11672433 of the ANGPTL4 gene with BAVM in the residents of the West Siberian region of Russia. The meta-analysis has also not revealed an association with BAVMs for rs11672433 in ANGPTL4 (OR 1.18, 95% CI = 0.81-1.73,  $P$  = .3). Taking into account that we and Kremer et al have not found a significant association, and as it has been found only in a pilot research, perhaps we had deal with the phenomenon "winner's curse."<sup>19</sup>

The limitation of all ANGPTL4 association studies is the small sample size. The statistical power to detect association in the provided meta-analysis with OR = 1.18 and  $P$  = .16 is only 20%. For 80% statistical power, it would be necessary to examine about 2200 person cases and 2200 controls.

Finally, our data showed that SNP rs11672433 was not associated with BAVM in the residents of the West Siberian region of Russia, and the following meta-analysis also did not detect an association. Thus, in spite of the fact that the ANGPTL4 (protein) participates in the angiogenesis regulation processes, we conclude that the high-frequency SNP rs11672433 in ANGPTL4 gene does not influence the predisposition to BAVM and processes of angiogenesis.

**Acknowledgment:** The study was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations program as support to bioscience collections (project 0309-2017-0009).

#### References

1. Talamonti C, Versari PP, D'Aliberti G, et al. Complex arteriovenous fistula of the brain in an infant. Case report. *J Neurosurg*. 1995;81:337-341.
2. Al-Shahi R, UK M, Bhattacharya JJ, et al. The Scottish Intracranial Vascular Malformation Study (SIVMS). 2003.
3. Robert WH, Robert HR. *International neuroangiography*. Philadelphia, PA: CRC Press, 2007.

4. Bauer AM, Bain MD, Rasmussen PA. Cx3c1 resorption with AVM revascularization after complete AVM obliteration. *Instr Neurosurg*. 2015;5:1051-1056.
5. Fishman SJ, Greene AK. Progression of arteriovenous malformation: possible role of vasculogenesis NIH public access. 2014;1254.
6. Caccho RN, Mshram RJ. Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochim. Biophys. Acta—Rev. Cancer* 2014; 1846:161-179.
7. Mikhaik B, Weisheimer S, Pawlikowska L, et al. Angiotensin-like 4 (ANGPTL4) gene polymorphisms and risk of brain arteriovenous malformations. *Cerebrovasc Dis* 2011;31:338-345.
8. Kremer FHC, Koelman BPC, Rinkel GJ, et al. Susceptibility loci for sporadic brain arteriovenous malformation: a replication study and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015; jnp-2014-310394.
9. Chang Y, Shah T, Yang J, et al. Association of genetic polymorphisms of angiotensin-like 4 with severity of posttransplant proteinuria in kidney allograft recipients. 2016.
10. Legry V, Bokor S, Costol D, et al. Associations between common genetic polymorphisms in angiotensin-like proteins 3 and 4 and lipid metabolism and adiposity in European adolescents and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:5070-5077.
11. Müntzlein A, Sady CH, Leiberer A, et al. Angiotensin-like protein 4 significantly predicts future cardiovascular events in coronary patients. *Atherosclerosis* 2014;237:632-638.
12. Staiger H, Machicao F, Werner R, et al. Genetic variation within the ANGPTL4 gene is not associated with metabolic traits in white subjects at an increased risk for type 2 diabetes mellitus. *Mesobolism* 2008;7:637-643.
13. Yan W, Koumei S, Chang S, et al. Variation in ANGPTL4 Provides Insights into Protein Processing and Function. *J Biol Chem* 2009;284:13213-13222.
14. Okbe Y, Yasuaga K, Suda T. Angiotensin-related/angiotensin-like proteins regulate angiogenesis. *Int J Hematol* 2004;80:21-28.
15. Suzuki H, Hasegawa Y, Ayer R, et al. Intracerebral hemorrhage research. *Acta Neurochir Suppl* 2011;111:231-236.
16. Kim L, Kim HG, Kim H, et al. Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiotensin-related protein that prevents endothelial cell apoptosis. *Biochem J* 2000;346:603-610.
17. Gao L, Ji SE, Yu YZ, et al. Role of Angpt4 in vascular permeability and inflammation. *Inflamm Res* 2014;63:13-22.
18. Chomet C, Cazas A, Fayo C, et al. Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiotensin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *FASEB J* 2009;23:940-949.
19. Nakada H, Inoue I, Nature Publishing Group. Meta-analysis of genetic association studies: methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse. *J Hum Genet* 2009;54:615-623.

Erkinova S.A., Sokolova E.A., Orlov K.Y., Kiselev V.S., Strelnikov N.V., Dubovoy A.V., Voronina E.N., Filipenko M.L. Angiotensin-like proteins 4 (ANGPTL4) gene polymorphisms and risk of brain arteriovenous malformation. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017 Dec 5. pii: S1052-3057(17)30595-5. DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.033 – первая страница и страница с разделом “Acknowledgments” («Благодарности») с указанием источника финансирования.



## Polymorphisms in inflammation-related genes and the risk of primary varicose veins in ethnic Russians

Alexandra Shadrina<sup>1,2</sup> · Elena Voronina<sup>1,2</sup> · Mariya Smetanina<sup>1</sup> · Yakov Tsepilov<sup>2,3</sup> · Kseniya Sevost'ianova<sup>1</sup> · Andrey Shevela<sup>1</sup> · Evgeniy Seliverstov<sup>4</sup> · Elena Zakharova<sup>4</sup> · Evgeniy Ilyukhin<sup>5</sup> · Alexander Kirienko<sup>6</sup> · Igor Zolotukhin<sup>6</sup> · Maxim Filipenko<sup>1,2</sup>

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

### Abstract

Inflammation was shown to be activated in varicose veins, although its role in the development of vein wall transformation remains inconclusive. We aimed to investigate the influence of 13 inflammation-related single nucleotide polymorphisms (SNPs) *TNF* rs1800629 and rs3093661, *IL1A* rs1800587, *IL1RN* rs4251961, *IL6* rs1800795 and rs1800796, *IFNG* rs2430561, *IL10* rs1800896, *TGFB1* rs1800469, *HIF1A* rs11549465, *NFKB1* rs28362491, and rs4648068 on the risk of primary varicose veins (PVVs) in ethnic Russians. We genotyped 709 patients with PVVs and 278 individuals without a history of chronic venous disease and performed a single SNP and a haplotype analysis. Several associations with  $P < 0.05$  were revealed in our study. Variant allele *HIF1A* rs11549465 T, *TNF* rs3093661 A, and *NFKB1* rs28362491 ATTG deletion showed the reverse association with PVV risk, and allele *IL6* rs1800795 C was associated with the increased risk of the studied pathology. Haplotype analysis revealed associations of *TNF* haplotypes rs3093661 A-rs1800629 G and *IL6* rs1800795 C-rs1800796 G with the decreased and the increased risk of PVVs, correspondingly. However, all the observed associations failed to reach statistical significance after the correction for multiple testing, which was set at a level of  $10^{-5}$  due to many tests performed. Our study therefore provides evidence that investigated polymorphisms do not play a major role in susceptibility to PVVs.

**Keywords** Varicose veins · Cytokine · Inflammation · Single nucleotide polymorphism · Association · Russians

### Introduction

Varicose veins are a common vascular pathology affecting up to 30% of adult population in developed countries, with incidence increasing with age [1]. According to histologic and proteomic

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12026-017-8981-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alexandra Shadrina  
wener.alexser@gmail.com

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Privolnyy Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Private Surgery Center "Medalp", Saint Petersburg, Russia

Published online: 15 December 2017



[46]. Deletion of ATTG nucleotides in the promoter region of the *NFKB1* gene was shown to be associated with lower promoter activity [22] and reduced level of its downstream target gene product MCP-1 [23]. In the previous study, the association of a high-producing variant rs1024611 G in the *MCP1* gene with the increased risk of PVVs was demonstrated [18]. In the present study, we observed the reverse association of *NFKB1*-94 ATTG deletion allele with PVV risk in patients with C3 CEAP class, that is in line with the previous finding. It is noteworthy that both associations were revealed in patients without trophic changes.

Next, we found the association of a rare allele A of the polymorphism rs3093661 in the intron 1 of the *TNF* gene with the decreased risk of PVVs. Association was more significant in haplotype analysis, that demonstrated the effect for *TNF* rs3093661 A-rs1800629 G allele combination ( $P = 0.005$ , Table 4). The same haplotype was also found to be protective against autoimmune Graves' disease [47]. The *TNF* gene coding pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  is located in the major histocompatibility complex (MHC) region that is characterized by blocks with a high degree of linkage disequilibrium and contains many immune-related genes. SNP rs3093661 is the only polymorphism in our study, the effect of which on the level of the protein product has not previously been investigated. Rs3093661 tags FV1 TNF block haplotype in European populations [25]. So, it is possible that the association, if it is true, is attributable to other genes in this region.

Polymorphism rs1800795 (G-174C) locates in the promoter of the *IL6* gene, alters its ability to bind GATA1 transcription factor, and is associated with reduced *IL6* expression and low  $\alpha$  *IL6* level [32–34]. *IL-6* is a multifunctional cytokine that exhibits both pro-inflammatory and anti-inflammatory activities [48]. In our study, association of this locus with the increased PVV risk was observed in a single SNP and haplotype analyses (Tables 3 and 4), though the level of statistical significance was close to nominal even before the Bonferroni correction implementation. Potentially, increasing risk of PVVs could be due to suppression of anti-inflammatory functions of *IL-6*.

Finally, we observed the reverse association of SNP rs11549465 (C+172T) in the *HIF1A* gene with the risk of PVVs. *HIF1A* encodes an alpha subunit of heterodimeric hypoxia-inducible transcription factor HIF-1. HIF-1 induces the expression of multiple genes implicated in oxygen homeostasis, matrix metabolism, vascular tone maintenance, angiogenesis, apoptosis, and cell survival as well as inflammatory response [12, 49]. Hypoxia is supposed to be one of the causative factors in PVVs, and molecular studies have demonstrated its ability to cause inflammatory changes and vein wall remodeling similar to those observed in varicosities [8]. Expression of *HIF1A* was shown to be upregulated in varicose compared with non-varicose veins [50]. Since C+172T nucleotide substitution leads to higher HIF-1 $\alpha$  production and

stability [20, 21], our result is surprising and seems to be false positive finding.

### Conclusion

In the present study, we applied a candidate-gene approach and tested the association of 13 functional polymorphisms in the inflammation-related genes with the risk of PVVs. We revealed several associations with  $P < 0.05$ , namely the association of polymorphism *IL6* rs1800795 (G-174C) with the increased risk of PVVs and the reverse association of SNPs *HIF1A* rs11549465 (C+172T), *NFKB1* rs28362491 (-94 insertion/deletion ATTG), and *TNF* rs3093661 (G+419A) with this pathology. Nevertheless, none of the observed associations reached statistical significance after the implementation of correction for multiple comparisons. Therefore, our study did not provide strong evidence for the involvement of individual-specific differences in inflammatory response in the etiology of varicose veins. However, we still believe that not all associations could be false discoveries. Performing of many tests made us set a level of statistical significance of  $P = 10^{-5}$ . Probably, the effects of these SNPs are not so pronounced to reach this level. Our study was limited in power due to the small size of the studied groups, so our results should be treated with caution and considered as preliminary until independent validation is performed. We therefore recommend that future studies use larger study samples, at least 1000 patients in the case and 1000 subjects in the control group, to replicate our findings. In our opinion, the most interesting candidates for replication are polymorphism *NFKB1* rs28362491 and FV1 TNF block haplotype tagged by rs3093661. If our results are confirmed, studying NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  mRNA and protein level in varicose versus normal vein tissue would be beneficial. Finally, we find it useful to test whether the effects of polymorphisms are population-specific and to analyze study samples of different ethnic origins.

**Acknowledgments** This work was supported by Russian Science Fund (grant number 14-15-00734, "Searching of genes involved in varicose vein disease-pathology"), Science Branch of the Russian Academy of Sciences Complex scientific program, no. II.3P.VI.2.5 (0309-2015-0028), and Russian State funded budget project "Common Use Center of biomedical collection (DNA, RNA, and plasma) obtained from patients suffering from socially significant multifactorial diseases." (Project No 0309-2017-0009).

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in study were in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. The study was approved by the Ethics Committee of Institute of Chemical

Shadrina A.S., Voronina E.N., Smetanina M.A., Tsepilov Y.A., Sevost'ianova K.S., Shevela A.I., Seliverstov E.I., Zakharova E.A., Ilyukhin E.A., Kirienko A.I., Zolotukhin I.A., Filipenko M.L. Polymorphisms in inflammation-related genes and the risk of primary varicose veins in ethnic Russians. // *Immunologic research*. DOI : 10.1007/s12026-017-8981-4 – первая страница и страница с разделом “Acknowledgments” («Благодарности») с указанием источника финансирования.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### Стандартная операционная процедура «Идентификация и характеристика биоматериала пациентов»

	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН	Стр. 1 из 7
Идентификация и характеристика биоматериала пациентов		СОП-ЛФ-1.ИиХБП-001
Дата введения документа: « ____ » _____ 201 г.	Действительно до: « ____ » _____ 201 г.	Версия № 1
		Копия №

	Должность	ФИО	Подпись	Дата
<i>Утвердил:</i>	заведующий лабораторией фармакогеномики	Филипенко М.Л.		
<i>Составил</i> <i>(изменил):</i>	м.н.с лаборатории фармакогеномики	Соколова Е.А.		
	м.н.с лаборатории фармакогеномики	Дымова М.А.		

### СОП-ЛФ-ИиХБП-001

### Идентификация и характеристика биоматериала пациентов

#### 1. Введение, цель

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

#### 2. 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.

#### 3. 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.

#### 4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

#### 5. Материалы и оборудование

##### 5.1 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	Detalab, Испания
Штатив для пробирок 1,5-2 мл, на 80 мест	Axygen, США
Клейкая лента канцелярская Attache прозрачная 19 мм x 33 м (пластиковая втулка)	Attache, Россия
Маркер перманентный Paper Mate SHARPIE TWIN TIP, 1 мм	Paper Mate, США

## 5.2 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 (+4 <sup>0</sup> С) для хранения биоматериала (кровь), 2 штуки	Indesit, Италия
Морозильник низкотемпературный (-80 <sup>0</sup> С) для хранения биоматериала (плазма), 2 шт.	Thermo Scientific, США
Дистиллятор	SG-Wasser, Сингапур

## 5.3 Комплект спецодежды

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

## 6. Помещения

Проведение работ осуществляется на базе лаборатории фармакогеномики ИХБФМ.

## 7. Процедура

### 7.1 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  $(100 \pm 1)$  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 характеристика 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.

## 8. 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(2x15-01) «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.
9. 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.

10. 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	Старший лаборант
Проливание биологического материала в контейнере	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Сообщить об этом старшему лаборанту лаборатории</li> <li>2. Аккуратно удалить все содержимое из контейнера</li> <li>3. Провести дезинфекцию самого контейнера и всего содержимого контейнера, что соприкасалось с пролитым биоматериалом.</li> </ol>	Оператор	Старший лаборант
Испорченная сопроводительная документация (порвался, пролилось содержимое контейнера и т.д.)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Оператор в случае читабельности сопроводительной документации, переносит всю информацию на новый бланк.</li> <li>2. В случае нечитабельности, оператор сообщает старшему</li> </ol>	Оператор	Старший лаборант

	лаборанту, который связывается с старшей мед. сестрой учреждения .		
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	Старший лаборант


#### Список ознакомления

№	ФИО	Должность	Дата	Подпись исполнителя	Подпись руководителя
1	2	3	4	5	6

Данный документ конфиденциальный и без подписей недействителен

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

### Стандартная операционная процедура «Выделение ДНК из биоматериала пациентов»

	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН	Стр. 36 из 8
Выделение ДНК из биоматериала пациентов		СОП-ЛФ-2.ВДНК-001
Дата введения документа: « _____ » _____ 201 г.	Действительно до: « _____ » _____ 201 г.	Версия № 1 Копия № _____

	Должность	ФИО	Подпись	Дата
Утвердил:	заведующий лабораторией фармакогеномики	Филипенко М.Л.		
Составил (изменил):	м.н.с лаборатории фармакогеномики	Соколова Е.А.		

### СОП-ЛФ-ВДНК-001

#### Выделение ДНК из биоматериала пациентов

#### 1. Введение, цель

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

#### 2. Назначение

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

#### 3. Термины и определения

СОП – стандартная операционная процедура;

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

фенол-ТЕ – раствор фенола, уравновешенный ТЕ

#### 4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

#### 5. Материалы и оборудование

##### 5.1 Материалы и реактивы

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
--	----------------------------

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	«Ленпипет», Россия
Пробирки 15 мл, ПП, резьбовые, конические, с крышкой	Ахуген, США
Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл	Ахуген, США
Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без фильтра фильтром до 200 и до 1000 мкл	Ахуген, 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

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
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

## 5.2 Оборудование

Оборудование	НТД, производитель, страна
Холодильник -20 °С	КРАФТ, 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 «Тюменский 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

### 5.3 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

## 6. Помещения

Проведение работ осуществляется в помещениях лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

## 7. Процедура

### 7.1 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 1М 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 рН-метра до достижения рН=8.0. Доведите объем раствора до 1000 мл дистиллированной водой.

#### 7.1.4. Приготовление 1М раствора CaCl<sub>2</sub>

– взвесьте (11,1±0,1) г CaCl<sub>2</sub>, 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 1М раствора Tris-HCl и 10 мкл 1М раствора CaCl<sub>2</sub>, 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 °С.

#### 7.1.8. Приготовление раствора 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 рН-метра до достижения рН=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 1М раствора MgCl<sub>2</sub>



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

#### 7.1.12. Приготовление 5М 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 1М раствора MgCl<sub>2</sub>, 800 мкл 5М 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 рН-метра до достижения рН=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 1М раствора MgCl<sub>2</sub>, 8 мл 5М 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 °С. 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 рН, если рН не достиг значения 8.0, отберите верхнюю фазу;

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

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

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

### 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 (65 °C) и оставьте 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.
- П.10. Добавьте в каждую пробирку 200 мкл фенола, уравновешенного ТЕ и 200 мкл хлороформа. Тщательно перемешайте на вортексе.
- ВНИМАНИЕ: фенол-ТЕ – 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 °C 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 °C 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 65 °С на 15 минут. Затем образцы размесить на хранение в холодильник на -20 °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.

– невостробованные биологические образцы подвергаются списанию, инаktivации и уничтожению.

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

## 8. Охрана труда и техника безопасности

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

7. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;

8. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2x15-01) «Генерис»;

9. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;

10. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;

11. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;

12. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней

## 9. 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.

#### Список ознакомления

№	ФИО	Должность	Дата	Подпись исполнителя	Подпись руководителя
1	2	3	4	5	6

---

Данный документ конфиденциальный и без подписей недействителен

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Стандартная операционная процедура «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов»

	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН	Стр. 45 из 6
Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов		СОП-ЛФ-2.ХБП-001
Дата введения документа: « ____ » _____ 201 г.	Действительно до: « ____ » _____ 201 г.	Версия № 1
		Копия №

	Должность	ФИО	Подпись	Дата
<i>Утвердил:</i>	заведующий лабораторией фармакогеномики	Филипенко М.Л.		
<i>Составил</i> <i>(изменил):</i>	м.н.с лаборатории фармакогеномики лаборант лаборатории фармакогеномики	Соколова Е.А. Ширшова А.Н.		

### СОП-ЛФ-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.

#### 2. Назначение

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

#### 3. Термины и определения

СОП – стандартная операционная процедура;

#### 4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

#### 5. Материалы и оборудование

##### 5.1 Материалы и реактивы

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
Емкость для дезинфицирующего раствора	VITLAB, Германия

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
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	«Ленпипет», Россия
Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл, свободны от РНК-аз	Ахуген, США
Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл или 2,0 мл	Ахуген, США
Штатив на 15 мл, 40 мест, полипропилен, d 20 мм, 100 штук	Detalab, Испания
Штатив для пробирок 1,5-2 мл, на 80 мест	Ахуген, США
Клейкая лента канцелярская Attache прозрачная 19 мм x 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

## 5.2 Оборудование

Оборудование	НТД, производитель, страна
Холодильник +4 °С	Indesit, Италия
Кельвинатор -20 °С	Thermo Scientific, США
Кельвинатор -80 °С	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" CH511-115 (пластиковый корпус)	ARMED, Россия
Стерилизатор паровой вк-75-01	ЗАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», РФ
Дистиллятор	SG-Wasser, Сингапур
Источник бесперебойного питания	APC, США
Компьютер с принтером	ASUS, Китайская Республика

### 5.3 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

### 6. Помещения

Проведение работ осуществляется в помещениях лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

### 7. Процедура

#### 7.1 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  $(100 \pm 1)$  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  $-20 - -60$  °С, 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 информации следующие данные: дата разаликвочивания, ФИО исполнителя, объем перенесенного образца и количество аликвот, 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  $-60^{\circ}$ , если иное не указано в инструкции разработчика стабилизирующего раствора.

– не допускается аликвотирование 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  $-60^{\circ}\text{C}$ , если иное не указано в инструкции разработчика стабилизирующего раствора.

– не допускается аликвотирование 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  $+4^{\circ}\text{C}$  не более двух суток, если предполагается дальнейшая обработка, или замораживают и хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

– 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 Размещение иного биоматериала для хранения

– иной биоматериал (ткани, моча, слюна, кал и др) хранят исходя из целесообразности: в целях последующего выделения ДНК/РНК замораживают при  $-20 \dots -60^{\circ}\text{C}$ .

#### 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 1 °С.
- 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.

#### 8. Охрана труда и техника безопасности


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

13. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
14. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2x15-01) «Генерис»;
15. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
16. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
17. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
18. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.



## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

### Стандартная операционная процедура «Контроль качества образцов биоматериала»

	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН	Стр. 52 из 8
Контроль качества образцов биоматериала пациентов		СОП-ЛФ-4.ККБ-001
Дата введения документа: « _____ » _____ 201 г.	Действительно до: « _____ » _____ 201 г.	Версия № 1 Копия № _____

	Должность	ФИО	Подпись	Дата
Утвердил:	заведующий лабораторией фармакогеномики	Филипенко М.Л.		
Составил (изменил):	м.н.с. лаборатории фармакогеномики	Соколова Е.А.		

## СОП-ЛФ-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.

#### 2. 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.

#### 3. 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.

#### 4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

## 5. Материалы и оборудование

### 5.1 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, Maximum 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 электрофореза	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

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
Бромистый этидий	Sigma, США

## 5.2 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 «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», РФ

## 5.3 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

## 6. Помещения

Проведение работ осуществляется в помещениях лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

## 7. Процедура

## 7.1 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 рН до 8.0 ледяной уксусной кислотой и довести объем раствора в мерном цилиндре 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 ( $1 \pm 0,1$ ) 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 °С 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%-го агарозного геля для РНК

– взвесить ( $1,5 \pm 0,1$ ) 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 °С 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 утилизировать 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  $A_{260/280}$ , 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  $A_{260/280}$ , 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 геле-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  $A_{260/280}$ , 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  $A_{260/280}$ , 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%-го 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 электрофореза, отсоединить провода от источника тока, перенести гель на трансиллюминатор геледокументирующего 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%-го 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 электрофореза, отсоединить провода от источника тока, перенести гель на трансиллюминатор геледокументирующего 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.

### 8. Охрана труда и техника безопасности

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

19. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
20. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2x15-01) «Генерис»;
21. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
22. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
23. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
24. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.

Список ознакомления


№	ФИО	Должность	Дата	Подпись исполнителя	Подпись руководителя
1	2	3	4	5	6

---

Данный документ конфиденциальный и без подписей недействителен

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

### Стандартная операционная процедура «Выделение РНК из биоматериала пациентов»

	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН	Стр. 61 из 7
Выделение РНК из биоматериала пациентов		СОП-ЛФ-5.ВРНК-001
Дата введения документа: « _____ » _____ 201 г.	Действительно до: « _____ » _____ 201 г.	Версия № 1 Копия № _____

	Должность	ФИО	Подпись	Дата
Утвердил:	заведующий лабораторией фармакогеномики	Филипенко М.Л.		
Составил (изменил):	м.н.с лаборатории фармакогеномики лаборант лаборатории фармакогеномики	Соколова Е.А. Ширшова А.Н.		

## СОП-ЛФ-ВРНК-001

### Выделение РНК из биоматериала пациентов

#### 1. Введение, цель

Настоящая методика устанавливает порядок выделения РНК из биологического материала

#### 2. Назначение

Выделение РНК значительно снижает ее деградацию во время хранения.

#### 3. Термины и определения

СОП – стандартная операционная процедура;

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

#### 4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

#### 5. Материалы и оборудование

##### 5.1 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

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
Штатив-подставка для пипеток универсальный на 5 дозаторов	«Ленпипет», Россия
Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся 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

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
Соляная кислота 37,0 %, Ph	Panreac, США
Трис(гидроксиметил)аминометан 99,9 %, MBG, для молекулярной биологии	Panreac, США
Мини-колодки Aurum RNA binding Columns, 50 шт.	Bio-Rad, США
Клейкая лента канцелярская Attache прозрачная 19 мм x 33 м (пластиковая втулка)	Attache, Россия
Маркер перманентный Paper Mate SHARPIE TWIN TIP, 1 мм	Paper Mate, США

## 5.2 Оборудование

Оборудование	НТД, производитель, страна
Холодильник +4 °С	Indesit, Италия
Кельвинатор -80 °С	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 «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», РФ
Весы	
pH-метр	Knick, ГДР
Дистиллятор	SG-Wasser, Сингапур
Источник бесперебойного питания	APC, США
Компьютер с принтером	ASUS, Китайская Республика

Источник бесперебойного питания 5 кВт	АРС, США
---------------------------------------	----------

### 5.3 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

### 6. Помещения

Проведение работ осуществляется в помещениях лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

### 7. Процедура

#### 7.1 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 тиоцианата в фальконе на 50 мл; добавить 40 мл MQ, полностью растворить гуанидин тиоцианат (быстрее при +65 °С);

- взвесить 2,58 г цитрата натрия в стеклянном стакане на 50 мл, добавить 10 мл MQ, размешать, довести кристаллами лимонной кислоты до pH=7,0, перенести в фалькон на 10 мл;

- к раствору гуанидин тиоцианата добавить 2,5 мл цитрата натрия pH=7,0 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, pH=7,0.



- 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 +65 °С, пока не расплавится.

- заполнить банку фенола деионизованной стерильной водой до горлышка (вообще достаточно 1/5-й от объёма фенола, ведь 100 г 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 +4 °С защищённом от света месте. Лучше использовать бутылки из стекла янтарного цвета, обёрнутые фольгой. В таком виде фенол будет стабилен несколько месяцев (минимум 3). Замораживать фенол не рекомендуется.

#### 7.1.3.3. Отмывочный буфер

- взвесить 1,97 г Tris-HCL, перенести в стакан на 50 мл, добавить 40 мл MQ, довести HCL до pH7,4, перенести в фалькон на 50 мл, хранить замороженным на –20 °С.

- смешать 41,6 мл 96% этанола; 0,5 мл Tris-HCL pH7,4; 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 +65 °С 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, инаktivации и уничтожению.

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

## 8. Охрана труда и техника безопасности

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

25. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;

26. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2x15-01) «Генерис»;

27. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
  28. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
  29. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
  30. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.
9. 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.

Список ознакомления


№	ФИО	Должность	Дата	Подпись исполнителя	Подпись руководителя
1	2	3	4	5	6

---

Данный документ конфиденциальный и без подписей недействителен

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

### Стандартная операционная процедура «Выделение циркулирующей ДНК из плазмы»

	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН	Стр. 68 из 12
Выделение циркулирующей ДНК из плазмы		СОП-ЛФ-6.ВиП-001
Дата введения документа: « ____ » _____ 201 г.	Действительно до: « ____ » _____ 201 г.	Версия № 1 Копия №

	Должность	ФИО	Подпись	Дата
Утвердил:	заведующий лабораторией фармакогеномики	Филипенко М.Л.		
Составил (изменил):	м.н.с. лаборатории фармакогеномики	Соколова Е.А.		
	м.н.с. лаборатории фармакогеномики	Дымова М.А.		
	м.н.с. лаборатории фармакогеномики	Оскорбин И.П.		

### 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.

#### 2. 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.

#### 3. 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.

#### 4. Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

## 5. Материалы и оборудование

### 5.1 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 ректифицированный из пищевого сырья	ГОСТ 5962-2013
Спирт изопропиловый	ГОСТ 9805-84
Буфер фосфатно-солевой (порошок) PBS 5л 10X, 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	Detalab, 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

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
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

## 5.2 Оборудование

Оборудование	НТД, производитель, страна
Шкаф лабораторный вытяжной с блоком УФ-облучения	ЗАО "ЛАМИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ", Россия
Холодильник (+4 <sup>0</sup> С) для хранения биоматериала (кровь), 2 штуки	Indesit, Италия
Морозильник низкотемпературный (-80 <sup>0</sup> С) для хранения биоматериала (плазма)	Thermo Scientific, США
Морозильник низкотемпературный (-80 <sup>0</sup> С) 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

### 5.3 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

## 6. Помещения

Проведение работ осуществляется на базе лаборатории фармакогеномики ИХБФМ.

## 7. Процедура

### 7.1 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 °С. 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 +4<sup>0</sup>С), поставить в рабочий штатив;
- Остальные образцы немедленно убрать обратно в холодильник, на +4<sup>0</sup>С;
- 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 -78 - -80 °С.
- 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 инаktivации 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 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 течение 30 с. Убедитесь визуально, что смесь перемешана. 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 течение 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 течение 15-30 с.
7. Инкубируйте смесь лизат-буфер ACB в пробирке в течение 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 выбросьте 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°C). 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 -78...-80 °C.

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 -65...-68 °C, 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 в экстренных ситуациях и 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).

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.

#### 8. Охрана труда и техника безопасности

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

31. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
32. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2x15-01) «Генерис»;
33. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
34. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
35. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
36. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.

#### 9. 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.
7. Ссылка на сайт производителя с инструкцией протокола выделения:  
<https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=0c4b31ab-f4fb-425f-99bf-10ab9538c061&lang=en>

#### 10. Приложение.

Protocol: Purification of Circulating Nucleic Acids from 1 ml, 2 ml, or 3 ml Serum or Plasma

This protocol is for purification of circulating DNA and RNA from 1 ml, 2 ml, or 3 ml of serum or plasma. For 4 ml or 5 ml, see “Protocol: Purification of Circulating Nucleic Acids from 4 ml or 5 ml Serum or Plasma”, page 26. For purification of circulating DNA and RNA from urine samples, see “Protocol: Purification of Circulating Nucleic Acids from 1 ml, 2 ml, or 3 ml of Urine”, page 30 or “Protocol: Purification of Circulating Nucleic Acids from 4 ml of Urine”, page 34. For purification of circulating RNA and miRNA, see “Protocol: Purification of Circulating microRNA from 1 ml, 2 ml, or 3 ml Plasma, Serum, or Urine”, page 38.

Important points before starting

- \_ Green (marked with a \_) denotes \_ sample volumes of 1 ml serum or plasma;
- blue (marked with a \_) denotes \_ sample volumes of 2 ml serum or plasma;
- red (marked with a \_) denotes \_ sample volumes of 3 ml serum or plasma.
- \_ All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- \_ Switch off vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during protocol steps.

Things to do before starting

- \_ Equilibrate samples to room temperature.
- \_ If samples are \_ <1 ml, \_ <2 ml, or \_ <3 ml, bring the volumes up to \_ 1 ml, \_ 2 ml, or \_ 3 ml with phosphate-buffered saline.
- \_ Set up the QIAvac 24 Plus as described on pages 18–21.
- \_ Heat a water bath or heating block to 60°C for use with 50 ml centrifuge tubes in step 4.
- \_ Heat a heating block to 56°C for use with 2 ml collection tubes in step 14.
- \_ Equilibrate Buffer AVE to room temperature for elution in step 15.
- \_ Ensure that Buffer ACB, Buffer ACW1, and Buffer ACW2 have been prepared according to the instructions on page 14.
- \_ Add carrier RNA reconstituted in Buffer AVE to Buffer ACL according to instructions on pages 14–15 and Table 2.

**Table 2. Volumes of Buffer ACL and carrier RNA (dissolved in Buffer AVE) required for processing ■ 1 ml, ▲ 2 ml, or ● 3 ml samples**

Number of samples	Buffer ACL (ml)			Carrier RNA in Buffer AVE (µl)
	■	▲	●	
1	0.9	1.8	2.6	5.6
2	1.8	3.5	5.3	11.3
3	2.6	5.3	7.9	16.9
4	3.5	7.0	10.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	28.1
6	5.3	10.6	15.8	33.8
7	6.2	12.3	18.5	39.4
8	7.0	14.1	21.1	45.0
9	7.9	15.8	23.8	50.6
10	8.8	17.6	26.4	56.3
11	9.7	19.4	29.0	61.9
12	10.6	21.1	31.7	67.5
13	11.4	22.9	34.3	73.1
14	12.3	24.6	37.0	78.8
15	13.2	26.4	39.6	84.4
16	14.1	28.2	42.2	90.0
17	15.0	29.9	44.9	95.6
18	15.8	31.7	47.5	101.3
19	16.7	33.4	50.2	106.9
20	17.6	35.2	52.8	112.5
21	18.5	37.0	55.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	123.8
23	20.2	40.5	60.7	129.4
24	21.1	42.2	63.4	135.0

#### Procedure

1. Pipet \_ 100 µl, \_ 200 µl, or \_ 300 µl QIAGEN Proteinase K into a 50 ml centrifuge tube (not provided).
2. Add \_ 1 ml, \_ 2 ml, or \_ 3 ml of serum or plasma to the 50 ml tube.
3. Add \_ 0.8 ml, \_ 1.6 ml, or \_ 2.4 ml Buffer ACL (containing 1.0 µg carrier RNA).

Close the cap and mix by pulse-vortexing for 30 s.

Make sure that a visible vortex forms in the tube. In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer ACL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

Note: Do not interrupt the procedure at this time. Proceed immediately to step 4 to start the lysis incubation.

4. Incubate at 60°C for 30 min.
5. Place the tube back on the lab bench and unscrew the cap.
6. Add \_ 1.8 ml, \_ 3.6 ml, or \_ 5.4 ml Buffer ACB to the lysate in the tube. Close the cap and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15–30 s.
7. Incubate the lysate–Buffer ACB mixture in the tube for 5 min on ice.
8. Insert the QIAampMini column into the VacConnector on the QIAvac 24 Plus. Insert a 20 ml tube extender into the open QIAamp Mini column. Make sure that the tube extender is firmly inserted into the QIAamp Mini column in order to avoid leakage of sample. Note: Keep the collection tube for the dry spin in step 13.
9. Carefully apply the lysate–Buffer ACB mixture from step 7 into the tube extender of the QIAamp Mini column. Switch on the vacuum pump. When all lysates have been drawn through the columns completely, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar. Carefully remove and discard the tube extender. Please note that large sample lysate volumes (about 11 ml when starting with 3 ml sample) may need up to 10 minutes to pass through the QIAamp Mini membrane by vacuum force. For fast and convenient release of the vacuum pressure, the Vacuum Regulator should be used (part of the QIAvac Connecting System). Note: To avoid cross-contamination, be careful not to move the tube extenders over neighboring QIAamp Mini Columns.
10. Apply 600 µl Buffer ACW1 to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open, and switch on the vacuum pump. After all of Buffer ACW1 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.
11. Apply 750 µl Buffer ACW2 to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open, and switch on the vacuum pump. After all of Buffer ACW2 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.
12. Apply 750 µl of ethanol (96–100%) to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open, and switch on the vacuum pump. After all of ethanol has been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.
13. Close the lid of the QIAamp Mini column. Remove it from the vacuum manifold, and discard the VacConnector. Place the QIAamp Mini column in a clean 2 ml collection tube, and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.
14. Place the QIAamp Mini Column into a new 2 ml collection tube. Open the lid, and incubate the assembly at 56°C for 10 min to dry the membrane completely.



15. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 ml elution tube (provided) and discard the 2 ml collection tube from step 14. Carefully apply 20–150 µl of Buffer AVE to the center of the QIAamp Mini membrane. Close the lid and incubate at room temperature for 3 min.

Important: Ensure that the elution buffer AVE is equilibrated to room temperature (15–25°C). If elution is done in small volumes (<50 µl) the elution buffer has to be dispensed onto the center of the membrane for complete elution of bound DNA. Elution volume is flexible and can be adapted according to the requirements of downstream applications. The recovered eluate volume will be up to 5 µl less than the elution volume applied to the QIAamp Mini column.

16. Centrifuge in a microcentrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min to elute the nucleic acids. QIAamp

#### Список ознакомления

№	ФИО	Должность	Дата	Подпись исполнителя	Подпись руководителя

---

Данный документ конфиденциальный и без подписей недействителен

**ПРИЛОЖЕНИЕ И**  
**Календарный план работ**

**КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН**  
**мероприятий по инвентаризации и развитию биоресурсных коллекций научными**  
**организациями в рамках дополнительных тем государственного задания на**  
**выполнение фундаментальных научных исследований**  
**в III-IV-й кварталах 2017 года**

ИХБФМ СО РАН, Новосибирск

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

Этап календарного плана	Дата окончания работ
<b>Регистрация дополнительного госзадания в системе ПАРУС (Ученый секретарь Института).</b>	<b>25 июля</b>
<b>Регистрация дополнительного госзадания в системе ЦИТИС (Ученый секретарь Института).</b>	начато 28 июля
Подготовка Календарного плана работ по выполнению дополнительного государственного задания.	<b>28 июля</b>
Выполнение первого этапа экспериментальной верификации СОПов КБМЗ ИХБФМ СО РАН, включая: • СОП по идентификации и характеристике биоматериала пациентов на 1000 образцах ДНК, образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах плазмы человека.	<b>30 августа</b>
Формирование технологического паспорта КБМЗ ИХБФМ СО РАН. Описание полного набора ключевых стандартных операционных процедур (СОП), обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда КБМЗ ИХБФМ СО РАН.	<b>15 сентября</b>
Формирование смет и их научно-технического обоснования для стандартных операционных процедур коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН.	<b>25 сентября</b>
Размещение технологического паспорта КБМЗ на интернет-сайте КБМЗ ИХБФМ СО РАН.	<b>28 сентября</b>
Запись результатов первого этапа верификации СОПов в электронную базу КБМЗ ИХБФМ СО РАН.	<b>28 сентября</b>
Предоставление промежуточного отчета в Рабочую группу БРК.	<b>29 сентября</b>
Подготовка первой запланированной публикации на основе материалов коллекции и направление в рецензируемые журналы (Scopus, WoS).	<b>15 октября</b>
Выполнение второго этапа экспериментальной верификации СОПов КБМЗ ИХБФМ СО РАН, включая: • СОП «Хранение биоматериала (ДНК, РНК, плазма) пациентов» на 500 образцах ДНК, образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах плазмы человека • СОП «Контроля качества образцов биоматериала» на 500 образцах ДНК, образцах нуклеиновых кислот из 40 линий соматических клеток человека и на 300 образцах плазмы человека	<b>15 декабря</b>
Запись результатов второго этапа верификации СОПов в электронную базу КБМЗ ИХБФМ СО РАН.	<b>15 декабря</b>
Создание формата унифицированного описания образцов материала из	<b>15 декабря</b>

Первая страница календарного плана

КБМЗ ИХБФМ СО РАН в компьютерной базе биоматериалов человека.	
Запись информации в электронную базу данных КБМЗ ИХБФМ СО РАН о первичной инвентаризации материалов КБМЗ ИХБФМ СО РАН.	15 декабря
Подготовка второй запланированной публикации на основе материалов коллекции и направление в рецензируемые журналы (Scopus, WoS).	20 декабря
Отправка в печать первой публикации в рецензируемые журналы (Scopus, WoS).	20 декабря
<b>Подготовка итогового отчёта (готовит ответственный исполнитель).</b>	<b>25 декабря</b>
Размещение отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте коллекции КБМЗ ИХБФМ СО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.	29 декабря
Предоставление итогового отчета в Рабочую группу БРК.	29 декабря
<b>Утверждение итогового отчета по дополнительному госзаданию, оформленного по ГОСТУ на заседании Ученого совета Института.</b>	<b>31 декабря</b>
Отправка итогового отчета по дополнительному госзаданию руководителю соответствующей экспертной группы для анализа соответствия результатов и для формирования общего отчета по направлению.	3 января 2018
Совместно с планово-финансовой службой института ответственный исполнитель должен подготовить финансовый отчет по дополнительному госзаданию для ФАНО (Форма будет предоставлена позднее).	20 января 2018
Итоговый отчет по ДГЗ должен быть выложен в систему ПАРУС не позднее 5-го февраля 2018 г.	5 февраля 2018
Итоговый отчет по ДГЗ должен быть зарегистрирован в Системе ЦИТИС (Ученый секретарь Института) по окончании проекта.	сроки будут уточнены позднее

ИХБФМ СО РАН

Директор ИХБФМ СО РАН  
член-корреспондент РАН,  
доктор химических наук



Пышный Д.В.

МП

Вторая страница календарного плана