**ПРОТОКОЛ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ**

**Дата начала синтеза**

**/ /**  г.

**1.Подготовка посуды: операция проведена Да / Нет**

|  |  |
| --- | --- |
| **Порядок действий** | **Выполнение** |
| Вымыть посуду с детергентом | да нет |
| Вымыть посуду хромовой смесью | да нет |
| Троекратно ополоснуть посуду водой mQ или водой очищенной | да нет |
| Прогреть посуду в сухожаровом шкафу при Т=120 ℃ в течении 3 часов | да нет |
| Остывшую, чистую посуду разместить в шкафу для хранения посуды. | да нет |
| Примечание к этапу: | |

**Контроль этапа:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Дата подготовки посуды** | **Процедуру провел** | |
| **ФИО** | **Подпись** |
| / / г. |  |  |

**2.Подготовка реактивов на синтез: операция проведена Да / Нет**

|  |  |
| --- | --- |
| **Порядок действий** | **Выполнение** |
| Приготовить посуду и емкости для синтезатора | да нет |
| CPG и амидиты достать из холодильника и поместить в эксикатор на пол часа | да нет |
| Промаркировать емкости | да нет |
| Приготовить растворы | да нет |
| Удостоверится в гомогенности растворов | да нет |
| Передать приготовленные растворы на синтез | да нет |
| Примечание к этапу: | |

1. Раствор амидита dA объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Ацетонитрил | {{ MeCN\_dA }} |  | 0001644439 |  |
| Амидит dA | {{ dA }} |  | 11056575 |  |
| Общий объем | {{ MeCN\_dA }} |  | - |  |

2.Раствор амидита dC объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Ацетонитрил | {{ MeCN\_dC}} |  | 0001644439 |  |
| Амидит dC | {{ dC }} |  | 11050538 |  |
| Общий объем | {{ MeCN\_dC}} |  | - |  |

3.Раствор амидита dG объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Ацетонитрил | {{ MeCN\_dG }} |  | 0001644439 |  |
| Амидит dG | {{ dG }} |  | 11050551 |  |
| Общий объем | {{ MeCN\_dG }} |  | - |  |

4.Раствор амидита T объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Ацетонитрил | {{ MeCN\_dT}} |  | 0001644439 |  |
| Амидит T | {{ dT }} |  | 11056588 |  |
| Общий объем | {{ MeCN\_dT }} |  | - |  |

5.Раствор окислителя объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Тетрагидрофуран | {{ THF\_Ox }} |  | 0001452572 |  |
| Пиридин | {{ Py\_Ox }} |  | 0001345002 |  |
| Вода mQ/очищ | {{ H2O\_Ox }} |  | очищ |  |
| Йод | {{ I2\_Ox }} |  | партия №30 |  |
| Общий объем | {{ V\_Ox }} |  | - |  |

6.Раствор активатора объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Ацетонитрил | {{ MeCN\_Act }} |  | 0001644439 |  |
| 5-этилтиотетразол | {{ TET\_Act }} |  |  |  |
| Общий объем | {{ MeCN\_Act }} |  | - |  |

7.Деблокирующий раствор объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Дихлорэтан | {{ DCE\_Dbl }} |  | партия №3/18 |  |
| Дихлоруксусная кислота | {{ DCA\_Dbl }} |  |  |  |
| Общий объем | {{ V\_Dbl }} |  | - |  |

8.Раствор Cap A объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Тетрогидрофуран | {{ THF\_CPA }} |  | 0001452572 |  |
| Пропионовый ангидрид | {{ ANH\_CPA }} |  |  |  |
| Пиридин | {{ Py\_CPA }} |  | 0001345002 |  |
| Общий объем | {{ V\_CPA }} |  | - |  |

9.Раствор Cap B объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Тетрагидрофуран | {{ THF\_CPB }} |  | 0001452572 |  |
| *N*-Метилимидазол | {{ MeIm\_CPB }} |  |  |  |
| Общий объем | {{ V\_CPB }} |  | - |  |

10.Раствор АМА объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Аммиак водный, 30% | {{ NH3\_AMA }} |  | 0001452143 |  |
| Метиламин водный, 38% | {{ MeNH2\_AMA }} |  |  |  |
| Общий объем | {{ V\_AMA }} |  | - |  |

11.Ацетонитрил объемом \_\_\_\_\_\_\_ мл. / / г. / / г. / .

Дата приготовления Срок годности Ф.И.О. Подпись

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Расчётное количество | Фактическое количество | Лот / Партия | Примечание |
| Ацетонитрил | По требованию |  | 0001644439 |  |

**3.Подготовка колонок для синтеза: операция проведена Да / Нет**

|  |  |
| --- | --- |
| **Порядок действий** | **Выполнение** |
| Получить чистые, пустые колонки для синтеза | да нет |
| Изготовить пробойником и установить нижний фильтр в колонку | да нет |
| Установить колонку на весы и тарировать их | да нет |
| Отмерить и поместить в колонку 8,0 – 10,0 мг CPG | да нет |
| Снять колонку с весов | да нет |
| Изготовить пробойником и установить верхний фильтр в колонку | да нет |
| Передать готовые колонки на синтез | да нет |
| Примечание к этапу: | |

**Контроль этапа:**

|  |  |
| --- | --- |
| **Наименование** | **Лот, партия** |
| Универсальное CPG lcca 500A, UniLinker | Lot #: AT77-14 |
| dA-CPG (1000 A) | - |
| dG-CPG (1000 A) | **-** |
| dC-CPG (1000 A) | **-** |
| T-CPG (1000 A) | **-** |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ п/п** | **Масса CPG, мг** | **Тип CPG** | **Способ заполнения колонок** | **Цвет колонки** | **Примечания** |
| 1 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 2 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 3 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 4 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 5 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 6 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 7 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 8 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 9 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 10 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 11 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 12 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 13 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 14 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 15 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |
| 16 |  | {{ CPG }} | {{ CPG\_state }} |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Дата приготовления колонок** | **Количество колонок** | **Процедуру провел** | |
| **ФИО** | **Подпись** |
| / / г. |  |  |  |

**4.Процедура синтеза: операция проведена Да / Нет**

|  |  |
| --- | --- |
| **Порядок действий** | **Выполнение** |
| Включить синтезатор, управляющий компьютер, компрессор | да нет |
| Получить емкости с реактивами и колонки для синтеза | да нет |
| Установить подачу аргона из общей магистрали, проверить значение давления в 1,5 барр | да нет |
| Установить емкости с реактивами на посадочные разъёмы синтезатора | да нет |
| Открыть вентиль аргона | да нет |
| Открыть вентиль сжатого воздуха | да нет |
| Открыть вентили реагентов и амидитов | да нет |
| Запустить программу H-16 расположенную на “Рабочем столе” | да нет |
| Выбрать “Control”→”Manual Control”→2\*“Emp.Tr.Mon.”+”Wash.Tr.Mon”+2\*“Emp.Tr.Mon.” | да нет |
| Установить колонки для синтеза в синтезатор | да нет |
| Выбрать “Control” →”Start”→Два раза провести “PRIME DNA” | да нет |
| Выбрать ячейку “Sequence”, выбрать требуемую последовательность олигонуклеотида | да нет |
| Установить значение “DMT OFF” – “YES” | да нет |
| Установить значение типа используемого CPG – “Universal” | да нет |
| Выбрать метод синтеза “DNA-RNA-X-method” | да нет |
| Нажать кнопку “START”, следить за показаниями синтеза до окончания процесса | да нет |
| Нажать кнопку “STOP”, после окончания синтеза | да нет |
| Снять колонки для синтеза с синтезатора и установить на их место пустые колонки | да нет |
| Убрать колонки в промаркированные пробирки | да нет |
| Передать колонки с синтеза на постобработку | да нет |
| Провести процедуру “SHUT DOWN”, при необходимости | да нет |
| Перекрыть вентили аргона и реагентов | да нет |
| Не перекрывать вентиль линии высокого давления | да нет |
| Перекрыть подачу аргона на общей магистрали | да нет |
| Заменить бутылки с реактивами на пустые бутылки для хранения капилляров | да нет |
| Передать емкости с неизрасходованными реактивами на хранение | да нет |
| Слить реактивы не предназначенные для хранения в отходы | да нет |
| Передать пустые емкости на очистку | да нет |
| Выключить синтезатор, управляющий компьютер | да нет |
| Не выключать компрессор | да нет |
| Перенести капилляры “Waste” в емкость для хранения капилляра | да нет |
| Примечания к этапу: | |

**Синтез план:**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ п/п** | **№ колонки** | **Шифр олигонуклеотида** | **Количество оснований, шт** | **Выход продукта по DMT-катиону** | **Примечания** |
| 1 |  | {{olig\_name\_1}} |  |  |  |
| 2 |  | {{olig\_name\_2}} |  |  |  |
| 3 |  | {{olig\_name\_3}} |  |  |  |
| 4 |  | {{olig\_name\_4}} |  |  |  |
| 5 |  | {{olig\_name\_5}} |  |  |  |
| 6 |  | {{olig\_name\_6}} |  |  |  |
| 7 |  | {{olig\_name\_7}} |  |  |  |
| 8 |  | {{olig\_name\_8}} |  |  |  |
| 9 |  | {{olig\_name\_9}} |  |  |  |
| 10 |  | {{olig\_name\_10}} |  |  |  |
| 11 |  | {{olig\_name\_11}} |  |  |  |
| 12 |  | {{olig\_name\_12}} |  |  |  |
| 13 |  | {{olig\_name\_13}} |  |  |  |
| 14 |  | {{olig\_name\_14}} |  |  |  |
| 15 |  | {{olig\_name\_15}} |  |  |  |
| 16 |  | {{olig\_name\_16}} |  |  |  |

**Контроль этапа:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Дата синтеза** | **Количество колонок** | **Процедуру провел** | |
| **ФИО** | **Подпись** |
| / / г. |  |  |  |

**5.Снятие и деблокирование олигонуклеотидов в АМА при комнатной температуре: операция проведена Да / Нет**

|  |  |
| --- | --- |
| **Порядок действий** | **Выполнение** |
| Получить колонки с синтезированными олигонуклеотидами | да нет |
| Подготовить и промаркировать требуемое количество центрифужных микропробирок | да нет |
| Извлечь верхний фильтр иглой | да нет |
| Высыпать содержимое колонки в центрифужную микропробирку надавив на верхний фильтр | да нет |
| Отмерить, в центрифужную микропробирку с CPG, автоматической пипеткой 1 мл раствора АМА | да нет |
| Установить центрифужные микропробирки в термошейкер без нагрева с перемешиванием в 450 об/мин на 2 часа. | да нет |
| Подготовить пустые центрифужные микропробирки с названиями олигонуклеотидов | да нет |
| Поочерёдно извлекая каждую микропробирку из термошейкера, открывать и переносить супернатант в пустые пробирки с соответствующими названиями олигонуклеотидов | да нет |
| Передать микропробирки с растворами олигонуклеотидов на упаривание | да нет |
| Примечание к этапу: | |

**5.Снятие и деблокирование олигонуклеотидов в АМА при температуре 65 ℃: операция проведена Да / Нет**

|  |  |
| --- | --- |
| **Порядок действий** | **Выполнение** |
| Получить колонки с синтезированными олигонуклеотидами | да нет |
| Подготовить и промаркировать требуемое количество центрифужных микропробирок | да нет |
| Извлечь верхний фильтр иглой | да нет |
| Высыпать содержимое колонки в центрифужную микропробирку надавив на верхний фильтр | да нет |
| Отмерить, в центрифужную микропробирку с CPG, автоматической пипеткой 1 мл раствора АМА | да нет |
| Установить в штатив для пробирок и накрыть вторым штативом сверху, зафиксировать по краям канцелярскими зажимами | да нет |
| Разместить штатив с микропробирками в сухожаровом шкафу на 65 ℃ на 1 час | да нет |
| Извлечь штатив из сухожарового шкафа, и остудить в холодильнике на -20 ℃ в течении 5 минут | да нет |
| Подготовить пустые центрифужные микропробирки с названиями олигонуклеотидов | да нет |
| Поочерёдно извлекая каждую микропробирку из штатива, открывать и переносить супернатант в пустые пробирки с соответствующими названиями олигонуклеотидов | да нет |
| Передать микропробирки с растворами олигонуклеотидов на упаривание | да нет |
| Примечание к этапу: | |

**5.Снятие и деблокирование олигонуклеотидов в растворе аммиака при температуре 65 ℃: операция проведена Да / Нет**

|  |  |
| --- | --- |
| **Порядок действий** | **Выполнение** |
| Получить колонки с синтезированными олигонуклеотидами | да нет |
| Подготовить и промаркировать требуемое количество центрифужных микропробирок | да нет |
| Извлечь верхний фильтр иглой | да нет |
| Высыпать содержимое колонки в центрифужную микропробирку надавив на верхний фильтр | да нет |
| Отмерить, в центрифужную микропробирку с CPG, автоматической пипеткой 1 мл водного 30% раствора аммиака | да нет |
| Установить в штатив для пробирок и накрыть вторым штативом сверху, зафиксировать по краям канцелярскими зажимами | да нет |
| Разместить планшет в сухожаровом шкафу на 55 ℃ на 8 час | да нет |
| Извлечь планшет из сухожарового шкафа, и остудить в холодильнике на -20 ℃ в течении 5 минут | да нет |
| Подготовить пустые центрифужные микропробирки с названиями олигонуклеотидов | да нет |
| Поочерёдно извлекая каждую микропробирку из штатива, открывать и переносить супернатант в пустые пробирки с соответствующими названиями олигонуклеотидов | да нет |
| Передать микропробирки с растворами олигонуклеотидов на упаривание | да нет |
| Примечание к этапу: | |

**Контроль этапа:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Дата деблокирования** | **Количество образцов** | **Процедуру провел** | |
| **ФИО** | **Подпись** |
| / / г. |  |  |  |

**6.Лиофилизация олигонуклеотидов: операция проведена Да / Нет**

|  |  |
| --- | --- |
| **Порядок действий** | **Выполнение** |
| Включить вакуумный испаритель | да нет |
| Получить растворы олигонуклеотидов в пробирках | да нет |
| Установить пробирки, с открытыми крышками, симметрично в отверстия ротора, закрыть крышку испрителя | да нет |
| Выбрать программу для работы испарителя | да нет |
| Запустить испаритель нажав кнопку “Run/Stop” | да нет |
| Включить вакуумный насос переключив тумблер на передней панели | да нет |
| Дождаться завершение программы, отключить вакуумный насос и испаритель | да нет |
| Убедится что образцы лиофилизировались | да нет |
| Передать образцы на хранение | да нет |
| Примечание к этапу: | |

**Контроль этапа:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Дата лиофилизации** | **Количество образцов** | **Процедуру провел** | |
| **ФИО** | **Подпись** |
| / / г. |  |  |  |

**7.Контроль документации:**

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ / / г

/Должность/ /Подпись/ /ФИО/ /Дата/

**Расход прекурсоров на этапе производства олигонуклеотидов**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№ п/п** | **Наименование прекурсора** | **Количество, мл.** | **Примечание** |
| 1 | Ацетонитрил |  |  |
| 2 | Тетрогидрофуран |  |  |
| 3 | Ацетон |  |  |