 <b>ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ</b>	<b>Система менеджмента качества Отдел синтеза олигонуклеотидов Участок выходного и постадийного контроля СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b>	<b>Лист 1 Листов 15</b>
<b>Проведение масс-спектрометрического анализа смесей олигонуклеотидов методом HPLC-ESI-IT-MS</b>		

## 1 Область применения

Настоящий документ определяет порядок проведения масс-спектрометрического анализа смесей олигонуклеотидов методом HPLC-ESI-IT-MS. Настоящий документ используется сотрудниками участка выходного и постадийного контроля отдела синтеза олигонуклеотидов ООО «ДНК-Технология ТС» для проведения масс-спектрометрического анализа образцов олигонуклеотидов с целью подтверждения правильности смешивания компонентов наборов индексов по соответствию масс олигонуклеотидов расчетным значениям и отсутствия загрязнения нецелевыми олигонуклеотидами, а также для обучения персонала.

## 2 Пересмотр

Внесение изменений в настоящий документ, изменение версий документа осуществляется в соответствии с ДП 4.2.4 согласно приложению В данного документа.

## 3 Персонал

Сотрудники участка выходного и постадийного контроля отдела синтеза олигонуклеотидов ООО «ДНК-Технология ТС».

Перечень лиц для ознакомления приведен в приложении Г данного документа.

## 4 Термины, сокращения и условные обозначения

В настоящем документе используются следующие термины, сокращения и условные обозначения:

Верификация	– подтверждение соответствия продукта предопределённым требованиям
ОСО	- отдел синтеза олигонуклеотидов ООО «ДНК-Технология ТС»
УВК ОСО	- участок выходного и постадийного контроля ОСО
УПР ОСО	- участок приготовления растворов ОСО
СОП	- стандартная операционная процедура
ОН	- олигонуклеотид
КТ	– комнатная температура (от 18 до 25 °C)
ТБО	- твердые бытовые отходы



## 5 Оборудование и программное обеспечение

Используемое в процедуре оборудование и программное обеспечение:

Наименование	Производитель
Масс-спектрометр Amazon SL с хроматографической системой Elute SP	Bruker Daltonik GmbH, Германия
ПО Compass HyStar 5.1	Bruker Daltonik GmbH, Германия
ПО TrapControl 8.0	Bruker Daltonik GmbH, Германия
ПО Compass DataAnalysis 5.2	Bruker Daltonik GmbH, Германия
Центрифуга Centry 101 (для планшетов)	Gilson, США или аналогичная
Дозаторы механические одноканальные с переменным объемом 0,5-10 мкл, 20-200 мкл	Eppendorf, Германия или аналогичный
Дозатор электронный 12-канальный с переменным объемом 10-300 мкл	Sartorius, Германия или аналогичный
Ёмкость для сбора загрязненного пластика	-
Персональный компьютер	-
Пакет программ, например Microsoft Office	Microsoft, США

## 6 Материалы и реагенты

Используемые в процедуре материалы и реагенты:

Наименование	Производитель	Условия хранения
Перчатки медицинские нестерильные без талька	Ansell, Франция или аналогичные	КТ
Планшет 96-луночный из полипропилена	Кат. 249944 или 267245, ThermoFisher Scientific, США Или аналогичные	КТ
Наконечники конические пластиковые объемом 200 мкл	Кат. 83710, Omnitip, Польша или аналогичные	КТ
Наконечники конические пластиковые объемом до 10 мкл	Кат. SSI 4110-00, SSI, США или аналогичные	КТ
Вода высокоочищенная (с удельным сопротивлением не менее 18,2 МОм*см (при 25 °C))	ООО «ДНК-Технология ТС», Россия	КТ
Подвижная фаза А1	ООО «ДНК-Технология ТС», Россия (по действующей версии СОП №31-ОСО-УВК)	КТ

	<b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b> <b>Проведение масс-спектрометрического анализа смесей олигонуклеотидов методом HPLC-ESI-IT-MS</b>	Лист 3 Листов 15
Подвижная фаза В1	ООО «ДНК-Технология ТС», Россия (по действующей версии СОП №31-ОСО-УВК)	КТ
Подвижная фаза А2ТЕА	ООО «ДНК-Технология ТС», Россия (по действующей версии СОП №31-ОСО-УВК)	КТ
Промывочный раствор	ООО «ДНК-Технология ТС», Россия (по действующей версии СОП № 32-ОСО-УВК)	КТ
Метанол Мультисолв (для УФ, ИК, ВЭЖХ и МС)	Кат. EVA-MEM, ООО «Гринвэн СПб», Россия или аналогичный	КТ
Колонка хроматографическая YMC-Triart C18 5 см*2,0мм внутр. диаметр, S-3 мкм, 120Å	Кат. TA12S03-0502WT, YMC LLC, Япония или аналогичная	КТ

## 7 Специальная информация

Все операции выполняются в помещении УВК ОСО в медицинских перчатках.

Перед проведением работ в соответствии с данной СОП необходимо ознакомиться с действующей версией регламента №07.07-ОСО «Проведение масс-спектрометрического анализа олигонуклеотидов методом HPLC-ESI-IT-MS».

Образцы смесей ОН передаются на УВК ОСО сотрудником УПР ОСО в промаркированном 96-луночном планшете в гриппер-пакете, на котором подписывается дата передачи образцов. Сотрудник УПР ОСО должен сделать запрос на проведение контроля в виде электронного письма на адрес: [iqc@dna-technology.ru](mailto:iqc@dna-technology.ru) с указанием названия набора, а также содержащего информацию о планшете и переданных образцах в виде вложенного файла. Пример файла приведен в приложении А.


## 8 Процедура

### 8.1 Анализ смесей олигонуклеотидов, используемых при производстве наборов АнеуПГТ и Клинекзом

8.1.1 Получить запрос на проведение анализа электронным письмом. Получить промаркированный 96-луночный планшет. В каждой лунке планшета находится 10 мкл образца с общей концентрацией олигонуклеотидов  $C=5$  пикомоль/мкл.

8.1.2 Подготовить шаблон отчета о результатах анализа. Для этого с помощью программы Excel открыть файл-шаблон, находящийся по адресу M:\Синтез\Участок выходного контроля\HPLC-MS\отчеты\Шаблон для подтверждения массы смесей.xlsm. Скопировать в него данные по образцам из файла, присланного электронным письмом.

8.1.3 Автоматический произойдет заполнение столбцов «MCalc1» и «MCalc2» данными по рассчитанным массам для каждого из двух олигонуклеотидов в смеси. Это происходит, так как ячейки столбцов «MCalc1» и «MCalc2» содержат

	<p align="center"><b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b>  <b>Проведение масс-спектрометрического</b>  <b>анализа смесей олигонуклеотидов методом</b>  <b>HPLC-ESI-IT-MS</b></p>	<p align="right">Лист 4 Листов 15</p>
---	---	---

формулу, которая возвращает массы олигонуклеотидов из файла «полный masslist.xls».

8.1.4 Выполнить подготовку прибора в соответствии с п 8.2 регламента №7.07-ОСО.

8.1.5 Запустить необходимые программы в соответствии с п. 8.4.1-8.4.3 регламента №7.07-ОСО.

8.1.6 Отредактировать таблицу для образцов в программе, убрав из нее столбец «Expected Mass» и добавив столбцы «SampleMW1» и «SampleMW2». Для этого необходимо кликнуть правой кнопкой мыши на заголовок таблицы и убрать/поставить галочки напротив соответствующих столбцов.

8.1.7 Заполнить таблицу по аналогии с п. 8.4.4-8.4.10 регламента №7.07-ОСО.

8.1.8 В столбец Sample ID скопировать данные из столбца «Название адаптера» шаблона отчета, созданного ранее.

8.1.9 В столбцы «SampleMW1» и «SampleMW2» копировать данные столбцов «MCalc1» и «MCalc2» соответственно. Внимание: меньшая масса должна быть в столбце «SampleMW1», а большая - в столбце «SampleMW2».

8.1.10 В столбец Volume внести значение - 10 мкл.

8.1.11 В столбце Data Path создать папку, соответствующую дате передачи планшетов на анализ, типу набора и маркировке планшета. Таким образом, результаты анализа по каждому образцу будут находиться по адресу: D:\Data\\*тип набора\\*год\\*номер месяца\\*день\\*маркировка планшета\Sample ID\_Vial\_номер анализа.d\*. Например, для набора КлинЭкзом результаты анализа для одного из образцов могут располагаться по адресу: D:\Data\KlinEkzom\2024\03\12\SetC2\UDP0157\_H8\_12345.d

8.1.12 В столбце Method Set выбрать методику анализа: D:\Methods\Oligo\_methods\LCMSDA\_1.8min\_UDP\_YMC1CM.m

8.1.13 Поставить галочки в столбце Run Automated Processing.


8.1.14 Сохранить таблицу, нажав Save As. В выпавшем окне в графе Name вписать название, соответствующее текущей дате (дате проведения анализа) и маркировке планшета в формате год\_номер месяца\_день\_тип набора\_маркировка планшета (например, 2024\_03\_12\_AneyPGT\_SetC или 2024\_03\_12\_KlinEkzom\_SetC4).

8.1.15 Развести образцы в 96-луночном планшете в 8 раз, добавив высокоочищенную воду объемом 70 мкл с помощью электронного 12-канального дозатора с переменным объемом дозирования на 10-300 мкл. При добавлении воды не касаться пластиковыми наконечниками стенок лунок планшета и ранее добавленного образца.

8.1.16 Поместить планшет в прибор в соответствии с п. 8.3.4-8.3.6 регламента №7.07-ОСО.

8.1.17 Запустить анализ, нажав кнопку Start и в выпавшем меню выбрать Start Sequence. Время анализа одного 96-луночного планшета составляет около 4 часов.

8.1.18 После завершения анализа в столбце Status загорится надпись Processing Done. Это означает, что анализ завершён, а также успешно завершена автоматическая обработка результатов. После появления надписи Processing Done для всех образцов необходимо скопировать данные из столбца Data Path программы Hystar в шаблон отчета, созданного в п.8.1.2 в столбец «Data Path».

	<p align="center"><b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b>  <b>Проведение масс-спектрометрического</b>  <b>анализа смесей олигонуклеотидов методом</b>  <b>HPLC-ESI-IT-MS</b></p>	<p align="right">Лист 5 Листов 15</p>
---	---	---

8.1.19 В шаблоне отчета активировать проверку масс, обнаруженных на масс-спектре на соответствие расчетным массам проанализированных образцов. Для этого необходимо нажать кнопку «Run»

8.1.20 По окончании работы встроенного макроса ячейки столбца «ESI результат» заполнятся комментарием «+» и будут окрашены в зеленый цвет, что означает контроль пройден успешно: олигонуклеотиды смешаны верно. Также ячейки столбца «ESI результат» могут содержать «-» и быть окрашены в красный цвет, что означает, что контроль не пройден и есть ошибка в приготовленных смесях.

8.1.21 Если все образцы в п.8.1.20 успешно прошли контроль, то далее проводится выборочное измерение соотношения олигонуклеотидов в смеси. Для этого проводится ВЭЖХ-УФ-МС анализ 8-12 образцов из планшета.

8.1.22 Чтобы выполнить этот анализ необходимо перевести прибор в режим с использованием спектрофотометрического детектора, выполнив действия, описанные в пункте 8.1 СОП №37-ОС-УВК.

8.1.23 Оценить количество растворов A1, B1, A2, B2 которое будет потрачено для проведения анализа. На анализ одного образца требуется 1,5 мл подвижной фазы A1, 0,5 мл подвижной фазы B1, 4-5 мл подвижной фазы A2 и 1 мл подвижной фазы B2. Проверить, что в бутылках хроматографа с подвижными фазами A1, B1, A2, B2 есть необходимое для проведения анализа количество и дополнительно еще 100 мл раствора в качестве мертвого объема. При необходимости приготовить растворы A1, B1, A2 в соответствии с СОП № 31-ОСО-УВК и заполнить бутылки. В качестве подвижной фазы A2 используется раствор A2TEA, в качестве подвижной фазы B2 используется метанол.

8.1.24 Проверить, что в бутылки хроматографа с промывочным раствором уровень жидкости превышает отметку 100 мл. При необходимости приготовить промывочный раствор в соответствии с СОП № 32-ОС-УВК и заполнить бутылку.

8.1.25 Установить хроматографическую колонку с параметрами: неподвижная фаза C18, 5 см\*2,0мм внутр. диаметр, S-3 мкм, 120Å. Для этого открыть отсек термостата хроматографической колонки, отсоединить трубки от установленной в термостат колонки, открутив верхний и нижний фитинг. Закрыть концы отсоединенной колонки, вкрутив в концевые отверстия защитные фитинги.

8.1.26 Открутить защитные фитинги на колонке. Подсоединить трубки к колонке по очереди, уперев конец трубки в отверстие на конце колонки и, не отпуская его, закрутить фитинг по направлению часовой стрелки. При подсоединении необходимо соблюдать направление тока жидкости в соответствии со стрелочной маркировкой на колонке: стрелка на колонке должна быть ориентирована снизу вверх.

8.1.27 Отредактировать таблицу для образцов в программе HyStar, убрав из нее столбцы «SampleMW1» «SampleMW2» и добавив столбец «Expected Mass».

8.1.28 Заполнить таблицу по аналогии с п. 8.4.4-8.4.10 регламента №7.07-ОСО.


8.1.29 В столбец Sample ID скопировать данные из столбца «Название адаптера» шаблона отчета, созданного ранее.

8.1.30 В столбец «Expected Mass» вписать массы, примерно соответствующие средней массе олигонуклеотидов в смеси.

8.1.31 В столбец Volume вписать значение 27 мкл.

8.1.32 В столбце Data Path создать папку внутри папки, созданной в пункте 8.1.11 с названием «UV». Таким образом, результаты анализа по каждому образцу



	<p align="center"><b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УБК-2025</b>  <b>Проведение масс-спектрометрического</b>  <b>анализа смесей олигонуклеотидов методом</b>  <b>HPLC-ESI-IT-MS</b></p>	<p align="right">Лист 6 Листов 15</p>
---	---	---

будут находиться по адресу: D:\Data \\*тип набора\*\\*год\*\\*номер месяца\*\\*день\*\UV\ Sample ID\_Vial\_номер анализа.d\*.

8.1.33 В столбце Method Set выбирать методику анализа: D:\Methods\Oligo\_methods\Actual Analytic\LCMSDA\_UDP\_UV\_YMC\_TEA.m.

8.1.34 Сохранить таблицу, нажав Save As. В выпавшем окне в графе Name вписать название, соответствующее текущей дате (дате проведения анализа), маркировке планшета в формате год\_номер месяца\_день\_тип набора\_маркировка планшета и тип анализа (UV) (например, 2024\_03\_12\_AneyPGT\_SetC\_UV).

8.1.35 Установить время предзапуска, необходимое для уравнивания хроматографической колонки и выхода системы в режим готовности. В данном случае оно определяется рекомендованным временем прогрева спектрофотометрического детектора после того, как в нем включена дейтериевая лампа и составляет 30 мин. Кликнуть в верхней строке на белом фоне окна программы Compass HyStar клавишу «Acquisition». Далее выбрать «Preset Start Sequence Time», установить 30 мин и нажать «OK».

8.1.36 Запустить анализ, нажав кнопку Start и в выпавшем меню выбрать Start Sequence. Анализ начнется после истечения времени предзапуска. Время анализа одного образца составляет 21 минуту.

8.1.37 После завершения анализа в столбце Status загорится надпись Acquisition Done. Это означает, что анализ завершен. После появления надписи Acquisition Done открыть результаты анализа для обработки, кликнув правой кнопкой мыши на строку с образцом. В выпавшем меню выбрать Open in Data Analysis. Описание окна программы Data Analysis приведено на рисунке 6 регламента №7.07-ОСО.

8.1.38 В программе Data Analysis для проанализированного образца открыть УФ-хроматограмму и убрать другие хроматограммы по необходимости. Для этого нажать правой кнопкой мыши на образец в списке проанализированных образцов, в выпадающем меню выбрать Edit Chromatograms. В открывшемся окне (см. рисунок 2) напротив строки Type в выпадающем списке выбрать UV Chromatograms, напротив строки Signal в выпадающем списке выбрать 260 nm. Нажать кнопку «Add».

8.1.39 В том же окне необходимо удалить другие хроматограммы. Для этого на белом фоне выбрать хроматограмму «TIC.....» или «BPC.....», нажав на нее левой кнопкой мыши, далее нажать клавишу «Delete». Закрыть окно, нажав «OK».

8.1.40 Запустить автоматическое обнаружение пиков на хроматограмме. Для этого в верхней строке окна программы Data Analysis кликнуть мышкой Find и в выпадающем меню кликнуть Compounds – Chromatograms. Должны быть автоматически обнаружены два пика.

8.1.41 Для каждого обнаруженного пика автоматически был получен масс-спектр, который необходимо обработать (провести деконволюцию). Для этого выделить строку с результатами анализа текущего образца в левой части окна Data Analysis под название Analysis List, кликнув на него левой кнопкой мыши. В верхней строке окна программы Data Analysis кликнуть мышкой Deconvolute и в выпадающем меню кликнуть Mass Spectra.

8.1.42 По завершении процесса деконволюции провести составление масс-листа для всех полученных обработанных спектров. Для этого в верхней строке окна программы Data Analysis кликнуть мышкой Mass List и в выпадающем меню кликнуть Find.



8.1.43 На каждом из обработанных масс-спектров хроматографических пиков найти самый интенсивный пик и сопоставить значение его  $m/z$  с рассчитанной массой для каждого из двух олигонуклеотидов в смеси. Убедиться, что они соответствуют в пределах  $\pm 0,025\%$ . Как правило хроматографический пик 1 будет соответствовать ОН меньшей массы, а пик 2 – ОН с большей массой.

8.1.44 Заполнить столбец «Соотношение» шаблона отчета данными по значениям процентного содержания (Total Area %) из таблицы хроматографических пиков в нижней части окна Data Analysis.

8.1.45 Скопировать данные для всех образцов за исключением столбца «Data Path» из шаблона отчета и внести их в новый файл в программе Excel. Пример заполненного отчета приведен в приложении Б.

8.1.46 Сохранить файл отчета в папке по адресу: M:\Синтез\Участок выходного контроля\HPLC-MS\отчеты\\*тип набора\*\\*год\*, указав в названии файла маркировку планшета. Например, ссылка на один из отчетов по анализу смесей ОН для набора Клинекзом будет выглядеть следующим образом: M:\Синтез\Участок выходного контроля\HPLC-MS\отчеты\Клинекзом\2024\2024\_03\_12\_SetC3.xlsx. Закрыть файл.

8.1.47 Закрыть шаблон отчета без сохранения изменений.

8.1.48 После проведения анализа необходимо законсервировать хроматографическую колонку.

8.1.49 Для этого открыть окно управления хроматографическим насосом, нажав правой кнопкой мыши на Elute Pump Main на панели управления системой ВЭЖХ-МС и выбрав «Direct control».

8.1.50 После открытия окна управления насосом хроматографа напротив строки «Fraction B» ввести значение 100%.

8.1.51 Напротив строки «Flow» ввести значение 0,300 мл/мин.

8.1.52 Запустить процесс прокачивания подвижной фазы В2 через колонку, для этого необходимо нажать кнопку с голубой стрелочкой напротив строки «Fraction B». Подождать 25 минут.

8.1.53 Напротив строки «Flow» ввести значение 0 мл/мин и остановить процесс прокачивания подвижной фазы В2 через колонку, нажав кнопку с голубой стрелочкой напротив строки «Fraction B». Колонка законсервирована.

8.1.54 Достать планшет из-под образцов из автосэмплера. Утилизировать его как ТБО.


8.1.55 Отправить файл отчета с результатами на электронную почту ответным письмом на письмо с запросом на анализ.

8.1.56 Выключить спектрофотометрический детектор, если он не был выключен.

## **8.2 Анализ смесей олигонуклеотидов, используемых при производстве наборов АнеуСкринИЛМ**

8.2.1 Получить запрос на проведение анализа электронным письмом. Получить промаркированный 96-луночный планшет. В каждой лунке планшета находится 60 мкл образца, окрашенного в голубой цвет, с общей концентрацией олигонуклеотидов  $C=0,31$  пикомоль/мкл.

8.2.2 Подготовить шаблон отчета о результатах анализа. Для этого с помощью программы Excel открыть файл-шаблон, находящийся по адресу M:\Синтез\Участок выходного контроля\HPLC-MS\отчеты\Шаблон для

	<b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b> <b>Проведение масс-спектрометрического</b> <b>анализа смесей олигонуклеотидов методом</b> <b>HPLC-ESI-IT-MS</b>	Лист 8 Листов 15
---	---	---------------------

подтверждения массы смесей.xlsm. Скопировать в него данные по образцам из файла, присланного электронным письмом.

8.2.3 Автоматический произойдет заполнение столбцов «MCalc1» и «MCalc2» данными по рассчитанным массам для каждого из двух олигонуклеотидов в смеси. Это происходит, так как ячейки столбцов «MCalc1» и «MCalc2» содержат формулу, которая возвращает массы олигонуклеотидов из файла «полный masslist.xls».

8.2.4 Выполнить подготовку прибора в соответствии с п 8.2 регламента №7.07-ОСО.

8.2.5 Запустить необходимые программы в соответствии с п. 8.4.1-8.4.3 регламента №7.07-ОСО.

8.2.6 Отредактировать таблицу для образцов в программе, убрав из нее столбец «Expected Mass» и добавив столбцы «SampleMW1» и «SampleMW2». Для этого необходимо кликнуть правой кнопкой мыши на заголовок таблицы и убрать/поставить галочки напротив соответствующих столбцов.

8.2.7 Заполнить таблицу по аналогии с п. 8.4.4-8.4.10 регламента №7.07-ОСО.

8.2.8 В столбец Sample ID скопировать данные из столбца «Название адаптера» шаблона отчета, созданного ранее.

8.2.9 В столбцы «SampleMW1» и «SampleMW2» копировать данные столбцов «MCalc1» и «MCalc2» соответственно. Внимание: меньшая масса должна быть в столбце «SampleMW1», а большая - в столбце «SampleMW2».

8.2.10 В столбец Volume внести значение - 10 мкл.

8.2.11 В столбце Data Path создать папку, соответствующую дате передачи планшетов на анализ и маркировке планшета. Таким образом, результаты анализа по каждому образцу будут находиться по адресу: D:\Data\AneyILM\\*год\*\\*номер месяца\*\\*день\*\\*маркировка планшета\*\Sample ID\_Vial\_номер анализа.d\*.

8.2.12 В столбце Method Set выбрать методику анализа: D:\Methods\Oligo\_methods\LCMSDA\_1.8min\_UDI+xylylene\_YMC1CM.m

8.2.13 Поставить галочки в столбце Run Automated Processing.

8.2.14 Сохранить таблицу, нажав Save As. В выпавшем окне в графе Name вписать название, соответствующее текущей дате (дате проведения анализа) и маркировке планшета в формате год\_номер месяца\_день\_тип набора\_маркировка планшета (например, 2024\_03\_12\_AneyILM\_Set1).

8.2.15 Поместить планшет в прибор в соответствии с п. 8.3.4-8.3.6 регламента №7.07-ОСО.


8.2.16 Запустить анализ, нажав кнопку Start и в выпавшем меню выбрать Start Sequence. Время анализа одного 96-луночного планшета составляет около 4 часов.

8.2.17 После завершения анализа в столбце Status загорится надпись Processing Done. Это означает, что анализ завершён, а также успешно завершена автоматическая обработка результатов. После появления надписи Processing Done для всех образцов необходимо скопировать данные из столбца Data Path программы Hystar в шаблон отчета, созданного в п.8.1.2 в столбец «Data Path».

8.2.18 В шаблоне отчета активировать проверку масс, обнаруженных на масс-спектре на соответствие расчетным массам проанализированных образцов. Для этого необходимо нажать кнопку «Run»

8.2.19 По окончании работы встроенного макроса ячейки столбца «ESI результат» заполнятся комментарием «+» и будут окрашены в зеленый цвет, что означает контроль пройден успешно: олигонуклеотиды смешаны верно. Также



	<p align="center"><b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b>  <b>Проведение масс-спектрометрического</b>  <b>анализа смесей олигонуклеотидов методом</b>  <b>HPLC-ESI-IT-MS</b></p>	<p align="right">Лист 9 Листов 15</p>
---	---	---

ячейки столбца «ESI результат» могут содержать «-» и быть окрашены в красный цвет, что означает, что контроль не пройден и есть ошибка в приготовленных смесях.

8.2.20 Скопировать данные для всех образцов за исключением столбца «Data Path» из шаблона отчета и внести их в новый файл в программе Excel. Пример заполненного отчета приведен в приложении Б.

8.2.21 Сохранить отчет в папке по адресу: M:\Синтез\Участок выходного контроля\HPLC-MS\отчеты\\*год\*\АнеуИЛМ\\*маркировка планшета\*. Заккрыть файл.

8.2.22 Заккрыть шаблон отчета без сохранения изменений.

8.2.23 Достать планшет из-под образцов из автосэмплера. Утилизировать его как ТБО.

8.2.24 Отправить файл отчета с результатами на электронную почту ответным письмом на письмо с запросом на анализ.

### **8.3 Анализ смесей олигонуклеотидов, используемых при производстве наборов HLA-Эксперт и HLA-Типирование**

8.3.1 Получить запрос на проведение анализа электронным письмом. Получить промаркированный 96-луночный планшет. В каждой лунке планшета находится 15 мкл образца, окрашенного в голубой цвет, с общей концентрацией олигонуклеотидов C=5 пикомоль/мкл..

8.3.2 Подготовить шаблон отчета о результатах анализа. Для этого с помощью программы Excel открыть файл-шаблон, находящийся по адресу M:\Синтез\Участок выходного контроля\HPLC-MS\отчеты\Шаблон для подтверждения массы смесей.xlsm. Скопировать в него данные по образцам из файла, присланного электронным письмом.

8.3.3 Автоматический произойдет заполнение столбцов «MCalc1» и «MCalc2» данными по рассчитанным массам для каждого из двух олигонуклеотидов в смеси. Это происходит, так как ячейки столбцов «MCalc1» и «MCalc2» содержат формулу, которая возвращает массы олигонуклеотидов из файла «полный masslist.xls».

8.3.4 Выполнить подготовку прибора в соответствии с п 8.2 регламента №7.07-ОСО.

8.3.5 Запустить необходимые программы в соответствии с п. 8.4.1-8.4.3 регламента №7.07-ОСО.

8.3.6 Отредактировать таблицу для образцов в программе, убрав из нее столбец «Expected Mass» и добавив столбцы «SampleMW1» и «SampleMW2». Для этого необходимо кликнуть правой кнопкой мыши на заголовок таблицы и убрать/поставить галочки напротив соответствующих столбцов.


8.3.7 Заполнить таблицу по аналогии с п. 8.4.4-8.4.10 регламента №7.07-ОСО.

8.3.8 В столбец Sample ID скопировать данные из столбца «Название адаптера» шаблона отчета, созданного ранее.

8.3.9 В столбцы «SampleMW1» и «SampleMW2» копировать данные столбцов «MCalc1» и «MCalc2» соответственно. Внимание: меньшая масса должна быть в столбце «SampleMW1», а большая - в столбце «SampleMW2».

8.3.10 В столбец Volume внести значение - 5 мкл.

8.3.11 В столбце Data Path создать папку, соответствующую дате передачи планшетов на анализ и маркировке планшета. Таким образом, результаты анализа

	<b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b> <b>Проведение масс-спектрометрического</b> <b>анализа смесей олигонуклеотидов методом</b> <b>HPLC-ESI-IT-MS</b>	Лист 10 Листов 15
---	---	----------------------

по каждому образцу будут находиться по адресу: D:\Data\HLA\\*год\*\\*номер месяца\*\\*день\*\\*маркировка планшета\*\Sample ID\_Vial\_номер анализа.d\*.

8.3.12 В столбце Method Set выбрать методику анализа: D:\Methods\Oligo\_methods\LCMSDA\_1.8min\_UDI+xylylene\_YMC1CM.m

8.3.13 Поставить галочки в столбце Run Automated Processing.

8.3.14 Сохранить таблицу, нажав Save As. В выпавшем окне в графе Name вписать название, соответствующее текущей дате (дате проведения анализа) и маркировке планшета в формате год\_номер месяца\_день\_тип набора\_маркировка планшета (например, 2024\_03\_12\_HLA\_ts1-ts98).

8.3.15 Развести образцы в 96-луночном планшете в 16 раз, добавив высокоочищенную воду объемом 225 мкл с помощью электронного 12-канального дозатора с переменным объемом дозирования на 10-300 мкл. При добавлении воды не касаться пластиковыми наконечниками стенок лунок планшета и ранее добавленного образца.

8.3.16 Поместить планшет в прибор в соответствии с п. 8.3.4-8.3.6 регламента №7.07-ОСО.

8.3.17 Запустить анализ, нажав кнопку Start и в выпавшем меню выбрать Start Sequence. Время анализа одного 96-луночного планшета составляет около 4 часов.

8.3.18 После завершения анализа в столбце Status загорится надпись Processing Done. Это означает, что анализ завершён, а также успешно завершена автоматическая обработка результатов. После появления надписи Processing Done для всех образцов необходимо скопировать данные из столбца Data Path программы Hystar в шаблон отчета, созданного в п.8.1.2 в столбец «Data Path».

8.3.19 В шаблоне отчета активировать проверку масс, обнаруженных на масс-спектре на соответствие расчетным массам проанализированных образцов. Для этого необходимо нажать кнопку «Run»

8.3.20 По окончании работы встроенного макроса ячейки столбца «ESI результат» заполнятся комментарием «+» и будут окрашены в зеленый цвет, что означает контроль пройден успешно: олигонуклеотиды смешаны верно. Также ячейки столбца «ESI результат» могут содержать «-» и быть окрашены в красный цвет, что означает, что контроль не пройден и есть ошибка в приготовленных смесях.

8.3.21 Скопировать данные для всех образцов за исключением столбца «Data Path» из шаблона отчета и внести их в новый файл в программе Excel. Пример заполненного отчета приведен в приложении Б.

8.3.22 Сохранить отчет в папке по адресу: M:\Синтез\Участок выходного контроля\HPLC-MS\отчеты\\*год\*\HLA\\*маркировка планшета\*. Заккрыть файл.


8.3.23 Заккрыть шаблон отчета без сохранения изменений.

8.3.24 Достать планшет из-под образцов из автосэмплера. Утилизировать его как ТБО.

8.3.25 Отправить файл отчета с результатами на электронную почту ответным письмом на письмо с запросом на анализ.

## 9 Верификация

Выполняется в п.8.1.20, п.8.2.19, п.8.3.20

	<p align="center"><b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b>  <b>Проведение масс-спектрометрического анализа смесей олигонуклеотидов методом HPLC-ESI-IT-MS</b></p>	<p align="right">Лист 11 Листов 15</p>
---	---	--

## 10 Ссылки

ДП 4.2.4	Управление документацией системы менеджмента качества
№07.07-ОСО	Проведение масс-спектрометрического анализа олигонуклеотидов методом HPLC-ESI-IT-MS
СОП №37-ОС-УВК	Изменение конфигурации системы ВЭЖХ-МС
СОП № 31-ОСО-УВК	Приготовление подвижных фаз для ВЭЖХ-МС
СОП №32-ОС-УВК	Приготовление промывочного раствора для ВЭЖХ-МС

## 11 Приложения

Приложение А	Пример файла, содержащего информацию о смесях олигонуклеотидов, переданных на анализ
Приложение Б	Пример отчета по проведению анализа смесей олигонуклеотидов, переданных на анализ
Приложение В	Лист регистрации изменений
Приложение Г	Лист визирования

Приложение А

Пример файла, содержащего информацию о смесях олигонуклеотидов, переданных на анализ

	A	B	C	D	E	F
	№	ком.	№ Лунки	Название адаптера	Название ОН 7XX	Название ОН 5XX
1						
2	Set B от 2:					
3	1		A1	7UDP0097-5UDP0097	7UDP0097	5UDP0097
4	2		B1	7UDP0098-5UDP0098	7UDP0098	5UDP0098
5	3		C1	7UDP0099-5UDP0099	7UDP0099	5UDP0099
6	4		D1	7UDP0100-5UDP0100	7UDP0100	5UDP0100
7	5		E1	7UDP0101-5UDP0101	7UDP0101	5UDP0101
8	6		F1	7UDP0102-5UDP0102	7UDP0102	5UDP0102
9	7		G1	7UDP0103-5UDP0103	7UDP0103	5UDP0103
10	8		H1	7UDP0104-5UDP0104	7UDP0104	5UDP0104
11	9		A2	7UDP0105-5UDP0105	7UDP0105	5UDP0105
12	10		B2	7UDP0106-5UDP0106	7UDP0106	5UDP0106
13	11		C2	7UDP0107-5UDP0107	7UDP0107	5UDP0107
14	12		D2	7UDP0108-5UDP0108	7UDP0108	5UDP0108
15	13		E2	7UDP0109-5UDP0109	7UDP0109	5UDP0109
16	14		F2	7UDP0110-5UDP0110	7UDP0110	5UDP0110
17	15		G2	7UDP0111-5UDP0111	7UDP0111	5UDP0111
18	16		H2	7UDP0112-5UDP0112	7UDP0112	5UDP0112
19	17		A3	7UDP0113-5UDP0113	7UDP0113	5UDP0113
20	18		B3	7UDP0114-5UDP0114	7UDP0114	5UDP0114
21	19		C3	7UDP0115-5UDP0115	7UDP0115	5UDP0115
22	20		D3	7UDP0116-5UDP0116	7UDP0116	5UDP0116
23	21		E3	7UDP0117-5UDP0117	7UDP0117	5UDP0117
24	22		F3	7UDP0118-5UDP0118	7UDP0118	5UDP0118
25	23		G3	7UDP0119-5UDP0119	7UDP0119	5UDP0119
26	24		H3	7UDP0120-5UDP0120	7UDP0120	5UDP0120
27	25		A4	7UDP0121-5UDP0121	7UDP0121	5UDP0121
<div> <div> <div></div> <div></div> </div> <div> <div>set A</div> <div>set B</div> <div>set C</div> <div>set D</div> <div>Шаблон</div> <div>+</div> </div> </div>						

Приложение Б

Пример отчета по проведению анализа смесей олигонуклеотидов, переданных на анализ

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	№	ком.	№ Лунки	Название адаптера	Название ОН 7XX	Название ОН 5XX	Mcalc1	Mcalc2	ESI результат	Соотношение	Mobserved1	Mobserved2
2	Set B от 21.08.2023											
3	1		A1	7UDP0097-SUDP0097	7UDP0097	SUDP0097	15182	16241	+	50%/50%	15181	16241
4	2		B1	7UDP0098-SUDP0098	7UDP0098	SUDP0098	15276	16318	+		15276	16317
5	3		C1	7UDP0099-SUDP0099	7UDP0099	SUDP0099	15277	16322	+		15277	16321
6	4		D1	7UDP0100-SUDP0100	7UDP0100	SUDP0100	15147	16226	+		15147	16225
7	5		E1	7UDP0101-SUDP0101	7UDP0101	SUDP0101	15180	16320	+		15180	16320
8	6		F1	7UDP0102-SUDP0102	7UDP0102	SUDP0102	15182	16209	+		15182	16208
9	7		G1	7UDP0103-SUDP0103	7UDP0103	SUDP0103	15214	16318	+		15213	16318
10	8		H1	7UDP0104-SUDP0104	7UDP0104	SUDP0104	15180	16227	+		15179	16227
11	9		A2	7UDP0105-SUDP0105	7UDP0105	SUDP0105	15212	16318	+		15212	16317
12	10		B2	7UDP0106-SUDP0106	7UDP0106	SUDP0106	15180	16306	+	51%/49%	15180	16306
13	11		C2	7UDP0107-SUDP0107	7UDP0107	SUDP0107	15178	16238	+		15178	16238
14	12		D2	7UDP0108-SUDP0108	7UDP0108	SUDP0108	15196	16319	+		15196	16319
15	13		E2	7UDP0109-SUDP0109	7UDP0109	SUDP0109	15131	16257	+		15131	16256
16	14		F2	7UDP0110-SUDP0110	7UDP0110	SUDP0110	15180	16336	+		15179	16336
17	15		G2	7UDP0111-SUDP0111	7UDP0111	SUDP0111	15162	16285	+		15162	16284
18	16		H2	7UDP0112-SUDP0112	7UDP0112	SUDP0112	15181	16210	+		15181	16209
19	17		A3	7UDP0113-SUDP0113	7UDP0113	SUDP0113	15162	16258	+		15162	16257
20	18		B3	7UDP0114-SUDP0114	7UDP0114	SUDP0114	15131	16287	+		15130	16287
21	19		C3	7UDP0115-SUDP0115	7UDP0115	SUDP0115	15197	16273	+	51%/49%	15197	16272
22	20		D3	7UDP0116-SUDP0116	7UDP0116	SUDP0116	15148	16256	+		15148	16255
23	21		E3	7UDP0117-SUDP0117	7UDP0117	SUDP0117	15213	16273	+		15213	16273
24	22		F3	7UDP0118-SUDP0118	7UDP0118	SUDP0118	15229	16242	+		15229	16242
25	23		G3	7UDP0119-SUDP0119	7UDP0119	SUDP0119	15261	16240	+		15261	16240
26	24		H3	7UDP0120-SUDP0120	7UDP0120	SUDP0120	15164	16208	+		15164	16207
27	25		A4	7UDP0121-SUDP0121	7UDP0121	SUDP0121	15178	16303	+		15178	16303

set A

set B


set C

set D

Шаблон

+




	<p align="center"><b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b>  <b>Проведение масс-спектрометрического</b>  <b>анализа смесей олигонуклеотидов методом</b>  <b>HPLC-ESI-IT-MS</b></p>	<p align="right">Лист 14 Листов 15</p>
---	---	--

**Приложение В**

**Лист регистрации изменений**

Код документа	Дата ввода в действие	Краткое содержание изменений
38-01-ОСО-УВК-2025		Введен впервые
38-02-ОСО-УВК-2025		1. В п.8.1 добавлен анализ смесей для наборов КлинЭкзом. 2. В п.8.1.11, п.8.1.32 изменен адрес папки для хранения результатов анализа 3. В п.8.1.46 изменен адрес папки для хранения отчета.

	<p align="center"><b>СМК. СОП № 38-02-ОСО-УВК-2025</b>  <b>Проведение масс-спектрометрического</b>  <b>анализа смесей олигонуклеотидов методом</b>  <b>HPLC-ESI-IT-MS</b></p>	<p align="right">Лист 15 Листов 15</p>
---	---	--

**Приложение Г**  
**Лист визирования**

Должность	Ф.И.О.	Дата	Подпись
Утвердил:			
Начальник ОСО	Сергеев И.В.		
Разработал:			
Специалист по разработке и внедрению	Масленкова С. А.		
Согласовал:			
Заместитель генерального директора по производству ООО «ДНК-Технология ТС»	Потапов В.А.		
Специалист по качеству ООО «ДНК-Технология ТС»	Овсянников А.С.		
Заместитель начальника ОСО по производству	Лобанова С.Б.		
Заместитель начальника ОСО по разработке и внедрению	Маерле А.В.		
Начальник УПР ОСО	Полещук А. А.		
Начальник УВК ОСО	Карпова Н.А.		
Ознакомлен:			
Шляпкинова Е.С.	технолог УВК ОСО		
Кочеткова М.А.	технолог УВК ОСО		



Лист визирования

Внутренний документ "СОП 38-02-ОСО-УВК-2025 Проведение масс-спектрометрического анализа смесей олигонуклеотидов методом HPLC-ESI-IT-MS"

Должность	ФИО	Результат	Дата
Начальник ОСО	Сергеев Илья Викторович	Утверждено	29.10.2025
Заместитель генерального директора по производству	Потапов Владимир Александрович	Согласовано	08.10.2025
Начальник УВК ОСО	Карпова Надежда Алексеевна	Согласовано	08.10.2025
Начальник УПР ОСО	Полещук Альбина Александровна	Согласовано	14.10.2025
Заместитель начальника ОСО по производству	Лобанова Софья Борисовна	Согласовано	16.10.2025
Заместитель начальника ОСО по РИВ	Маерле Артем Владимирович	Согласовано	09.10.2025
Специалист по качеству	Овсянников Андрей Станиславович	Согласовано	17.10.2025

Подготовил  
Ответственный

Масленкова Светлана Александровна  
Лобанова Софья Борисовна